Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Untersuchungen zur Wirkung von Ascorbinsäure und Echinacin® auf die Funktion neutrophiler Granulozyten

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG KRAUSE
aus Ludwigsburg

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0029

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Untersuchungen zur Wirkung von Ascorbinsäure und Echinacin® auf die Funktion neutrophiler Granulozyten

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG KRAUSE
aus Ludwigsburg

1986

Dekan:	Professor Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. K. H. Schmidt
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Jahnke

gedruckt 1986 bei H.-J. Köhler , Reprografischer Betrieb , Tübingen

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	3
1.1	Allgemeine Immunologie	4
1.2	Historischer Überblick	6
1.3	Die Funktion des PMN bei Entzündung und Abwehr von Mikroorganismen	8
1.4	Pathophysiologie	10
2.	ASCORBINSÄURE UND HISTAMIN	18
2.1	E i n l e i t u n g	19
2.1.1	Histamin als Mediator der allergischen Reaktion	19
2.1.1.1	H_1 + H_2-Blocker	20
2.1.1.2	Histamin als Regulator der PMN-Funktion	20
2.1.2	Ascorbinsäure	21
2.1.2.1	Ascorbinsäure und Immunsystem	22
2.1.2.2	Ascorbinsäure und PMN-Funktion	23
2.1.2.3	Ascorbinsäure und Histaminabbau	25
2.1.3	Problemstellung	28
2.2	M e t h o d e n	29
2.2.1	Granulozytenisolierung	29
2.2.2	Chemotaxis	33
2.2.3	Chemilumineszenz	40
2.2.4	Intrazelluläres Ascorbat	44
2.3	E r g e b n i s s e	51
2.3.1	Granulozytenisolierung	51
2.3.2	Chemotaxis	53
2.3.3	Chemilumineszenz	58
2.3.4	Intrazelluläres Ascorbat	61
2.4	D i s k u s s i o n	65

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
3.	ECHINACIN	74
3.1	E i n l e i t u n g	75
3.1.1	Historischer Überblick	76
3.1.2	Botanik	77
3.1.3	Pharmakologie und Inhaltsstoffe	78
3.1.4	Versuche aus den 40iger und 50iger Jahren	80
3.1.5	Klinische Anwendung	81
3.1.6	Versuchsergebnisse der letzten 20 Jahre .	82
3.1.7	Problemstellung	84
3.2	M e t h o d e n	85
3.2.1	Granulozytenisolierung	85
3.2.2	Chemotaxis	85
3.2.3	Chemilumineszenz	89
3.3	E r g e b n i s s e	91
3.3.1	Granulozytenisolierung	91
3.3.2	Chemotaxis	91
3.3.3	Chemilumineszenz	111
3.4	D i s k u s s i o n	115
4.	PERSÖNLICHE BEMERKUNG	124
5.	Z U S A M M E N F A S S U N G	125
6.	LITERATURVERZEICHNIS	127

1. E I N L E I T U N G

1.1 Allgemeine Immunologie

Das Immunsystem dient wie alle Teilsysteme des Lebendigen dazu, daß ein Gleichgewicht zwischen komplexen und vielfach vernetzten Systemen im Körper erhalten bleibt, was allgemein als "Gesundheit" bezeichnet wird. Eine relativ geringe Zahl von morphologisch verschiedenen Zelltypen ist über eine Vielzahl von biochemischen Regulations- und Rückkopplungsmechanismen untereinander verknüpft. Diese Zellen modulieren die festgelegten Reaktionstypen der Immunantwort nach den jeweiligen Bedürfnissen des Organismus. Die Skala der Möglichkeiten reicht von überschießender Reaktion bis zur Anergie, d.h. es erfolgt keine merklich immunologische Antwort. Ein richtig funktionierendes Immunsystem bildet die Grundlage für den effektiven Schutz gegenüber Fremdkörpern, wie pathogene Mikroorganismen, und gegenüber körpereigenen Zellen, die sich neoplastisch verändert haben.

Das ursprüngliche Konzept, wonach spezifische und unspezifische Abwehr als zwei verschiedene Systeme beschrieben wurden, ist ungenügend und berücksichtigt nicht, daß Lymphozyten und Makrophagen als die hauptsächlichen zellulären Komponenten sich gegenseitig unterstützen und beeinflussen. Obwohl allgemein angenommen wird, daß die Makrophagen nicht spezifisch auf bestimmte Antigene reagieren, ist ihre Rolle bei der Antigenkonzentrierung und -präsentation entscheidend: der Makrophage ist dafür verantwortlich, welche T-Zelle (die an der spezifischen zellulären Immunantwort beteiligt ist) durch ein bestimmtes Antigen stimuliert und aktiviert wird.

Außerdem sezerniert der Makrophage verschiedene biologisch aktive Mediatoren, die in der Lage sind, sowohl die Art als auch die Intensität der T- und B- Zellantwort zu regulieren, indem die Zelldifferenzierung und Zellteilungsrate abgeschwächt oder verstärkt wird. ("Biological response modifiers")

B- und T- Lymphozyten sind hoch antigen-spezifische zelluläre Komponenten, deren Wirkung genetisch und molekular gesteuert und durch humorale Faktoren wie Komplementsystem, Immunglobuline und Mediatoren ergänzt wird. Zusätzlich spielt der Makrophage eine Schlüsselrolle im "processing" der Antigene und ist der Hauptvertreter des phagozytären Systems. Aktivierte Makrophagen stimulieren aber auch die Produktion von Interferon (ein Stoff, der zur Bekämpfung von viralen Infektionen wichtig ist) und die Funktion der neutrophilen Granulozyten (66) (siehe auch 1.3 und 1.4), die Bakterien und Pilze abwehren und bei allen akuten Entzündungen entscheidend sind.

1.2 Historischer Überblick

Frühe Beschäftigungen mit dem Phänomen der Immunität brachten die ersten aktiven Impfungen: im alten China und in Westasien war schon der Pockenschutz durch "Variolation", d.h. durch Überimpfung des Bläscheninhalts von Pockenkranken, bekannt. In Europa wurde die Pockenschutzimpfung im 18. Jahrhundert in England eingeführt. Die Entdeckung der "Mikroben" brachte erste Fortschritte zum Verständnis der Infektionskrankheiten.

1882 beobachtete METCHNIKOFF bewegliche Zellen, die in einer Fischlarve gegen eingedrungene Fremdorganismen vorgingen (117). Mehrere Jahre später führte er den Begriff "Phagozytose" ein und konnte zwei Arten von blutständigen Zellen differenzieren, den polymorphonukleären Leukozyten (PMN = neutrophiler Granulozyt) und den Makrophagen. PFEFFER und der Tübinger Ophthalmologe LEBER prägten den Begriff "Chemotaxis", um die Wanderung von PMN's in Richtung auf einen eingedrungenen Rosendorn hin zu beschreiben (107, 136).

Es folgte die Entdeckung von humoralen Faktoren der Immunität (Komplement, Agglutinine, Präzipitine, Opsonine), der Phänomene der Hypersensitivität (Arthus' Phänomen, Sanarelli-Swarzman-Phänomen, Serum-Krankheit, Anaphylaxie, Schultz-Dale' Reaktion) und die Entwicklung von spezifischen Anti-Seren sowie die klinische Anwendung der aktiven und passiven Impfung. Die enormen Fortschritte der Biochemie brachten vor und nach dem Zweiten Weltkrieg Kenntnisse über die Immunglobuline und gleichzeitig wurde die Morphologie des RES (Reticuloendotheliales System) erforscht.

Die Genetik brachte in den letzten Jahren zahlreiche Erkenntnisse über Vorgänge auf molekularer Ebene. Es begannen sich einige neue Zweige der Immunologie zu entwickeln wie Immunpathologie, Immungenetik, Transplantationsimmunologie, Tumorimmunologie.

Die Forschungsergebnisse auf diesem relativ jungen Wissenschaftszweig sind in den letzten Jahren exponentiell angestiegen, seitdem immer genauere Techniken für die biochemische und genetische Analytik und Synthese zur Verfügung stehen.

1.3. Die Funktion des PMN bei Entzündung und Abwehr von Mikroorganismen

In der Auseinandersetzung zwischen Wirt und pathogenen Mikroorganismen ist die Schnelligkeit, mit der sich die Abwehr aufbaut, von entscheidender Bedeutung. Die Ausbildung einer primären spezifischen Immunantwort dauert mehrere Tage. In diesem Zeitraum wäre der Wirtsorganismus längst von Keimen überschwemmt, wenn nicht die neutrophilen Granulozyten eingedrungene pathogene Keime sofort bekämpften. Zwar ist ihre Phagozytosefähigkeit im Vergleich zu Makrophagen und Zellen des RES weniger effektiv, doch ihre schnelle Mobilisierbarkeit und ihre große Zahl ermöglichen eine direkte Abwehr (192).

Jeder Entzündungsvorgang beginnt mit Schädigung und Untergang von Zellen im Gewebe. Es werden Mediatoren freigesetzt, die zunächst Vasokonstriktion, dann Vasodilatation der Arteriolen, Blutfülle der Kapillaren und Venolen und Blutstase mit anschließender Steigerung der Gefäßpermeabilität bewirken, was zum Austritt von Flüssigkeit und damit zum interstitiellen Ödem führt. Bereits nach wenigen Minuten beginnen die Leukozyten, sich am Rand der Gefäße, vor allem der Venolen, zu sammeln (Margination), dort festzukleben (Adhärenz) und die Gefäßwände zu durchwandern (Emigration); dann beginnen Makrophagen und neutrophile Granulozyten (= PMN's) sich auf den Ort der Entzündung hin zu bewegen (Chemotaxis). Die Mediatoren der Frühphase der Entzündung sind: Histamin, Serotonin, Kinine, Derivate der Arachidonsäure (Prostaglandine, HETE's, Leukotriene), Komplementfaktoren, Abbauprodukte des bakteriellen Stoffwechsels wie N-formylierte Tripeptide und andere noch ungeklärte Stoffe (172).

Die erste Linie der zellulären Abwehr bei der Entzündung bilden die neutrophilen Granulozyten (PMN), während die Spätphase durch die Monozyten beherrscht wird ("zweite Verteidigungslinie"). Eine weitere "Abwehrfront" wird von den Lymphozyten, den Plasmazellen (aktivierte B-Zellen, die Antikörper produzieren) und den Makrophagen gebildet (siehe auch 1.1). Wichtig ist diese immunologisch spezifische Abwehr bei Virusinfektionen zur Erkennung und Vernichtung von neoplastischen Zellen, bei Transplantationsabstoßungen und bei den "spezifischen Entzündungen" (Tuberkulose, Lepra, Lues) sowie Fremdkörperreaktionen und immunologischen Reaktionen.

Während die PMN's und die Makrophagen in der ersten Phase der Entzündung für die Phagozytose von Mikroorganismen und Gewebstrümmern und ihre intrazelluläre Vernichtung zuständig sind, beseitigen in der Spätphase Zellen des RES, Makrophagen und neutrophile Granulozyten (PMN) zugrundegegangenes Gewebe und das Exsudat. Durch die Freigabe von lysosomalen Enzymen der PMN's wird nekrotisches Material abgebaut, während die Monozyten abgestorbene Zellen und Gewebsdetritus phagozytieren.

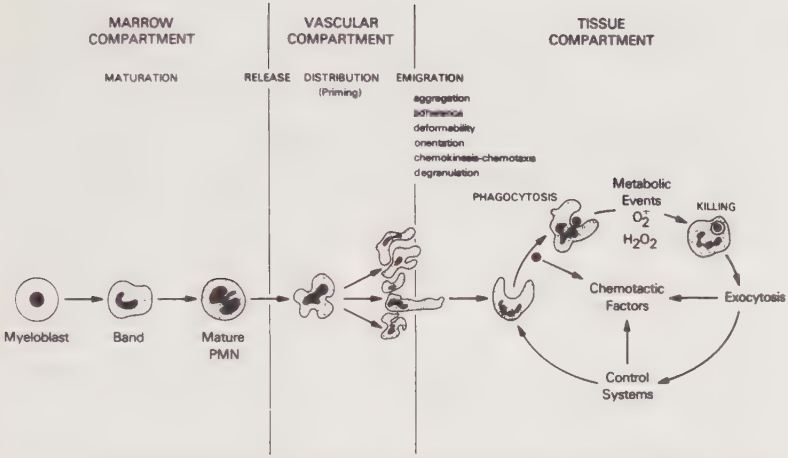
1.4 Pathophysiologie

Der neutrophile Granulozyt wird im Knochenmark aus einer Vorstufe, dem Promyeloblasten, über verschiedene Zwischenstufen gebildet. Die größte Zahl der reifen Zellen befindet sich im interstitiellen Raum (mehr als 50 %), ein Teil ist im Knochenmark (mehr als 30 %) und nur ca. 20 % wird im Blut transportiert (198). Die durchschnittliche Lebensdauer eines Granulozyten beträgt 4-5 Tage bei konstanten Bedingungen im Gewebe, seine Zirkulationszeit im Blut 6-20 Stunden (181).
Die Granulozytenpopulation, die sich im Blut aufhält, zerfällt in zwei Subgruppen: die eine Hälfte zirkuliert im Blutstrom (nur dieser Teil wird bei der üblichen Bestimmung der Leukozytenzahl erfaßt), während die andere Hälfte sich langsam entlang der Gefäßwände fortbewegt (marginal pool).

Schaubild 1 zeigt schematisch die einzelnen Funktionsschritte des PMN, die bei einer Entzündung ausgelöst werden. Zu Beginn der Entzündungsreaktion erhöht sich die Marginationsrate der PMN's, d.h. auch ein Teil der frei zirkulierenden Neutrophilen haftet am Gefäßendothel (Adhärenz). In vitro kann diese Eigenschaft an der Haftung mit verschiedenen Oberflächen untersucht werden. Es gibt eine Reihe von Substanzen, die diese "Klebrigkeit" erhöhen, vor allem Chemotaktika.

Nach der Emigration erfolgt die Chemotaxis, d. h. die aktive Wanderung entlang eines Konzentrationsgradienten (siehe 2.2.2).

Schaubild 1



Schematic diagram of the major functions of phagocytic cells in the inflammatory response. The events involved in neutrophil chemotaxis are depicted, but similar responses probably occur with monocytes. A defect anywhere in this system can result in compromised host defenses. PMN = polymorphonuclear leukocytes. (Modified from figure 1 in [10].)

Funktionen neutrophiler Granulozyten

aus (79)

Chemotaxis

Die Bewegung der Zelle erfolgt über Aktin-Myosin-Mikrofilamente; die Energie dafür liefert die anaerobe Glykolyse. Chemotaktische Aktivität besitzen neben Histamin und den Kininen die Komplementfaktoren, bakterielle Abbauprodukte (als Modell das synthetische Tripeptid N-f-Met-Leu-Phe), kollagenolytische Produkte aus Fibroblasten, Arachidonsäurederivate (HETE, Prostaglandine) und Substanzen, die beim Kontakt zwischen Leukozyten und Antigenen entstehen. Lymphozyten produzieren aber auch einen Stoff, der hemmend auf die Migration von Granulozyten wirkt: MIF (macrophage-immobilising-factor) verursacht eine Akkumulation der phagozytierenden Zellen im Entzündungsfeld (145).

Beim Kontakt von chemotaktischen Faktoren an der Zelloberfläche werden noch zusätzliche Ereignisse beobachtet: ein teilweiser Beginn des "respiratory burst" (s.u.) mit Chemilumineszenz und O_2^- - Produktion, eine erhöhte Expression der F_c - und der C_{3b}- Rezeptoren sowie eine teilweise Degranulation.

Opsonisierung

Spezifische Antikörper (IgG1, IgG3), spezifische Antikörper zusammen mit dem klassischen Weg der Komplementaktivierung und nicht spezifische Opsonisierung via alternativer Weg der Komplementaktivierung bereiten die spätere Ingestion vor, indem sie die Oberfläche der Mikroorganismen besetzen.

Zusätzlich werden noch diskutiert: Oberflächenphagozytose (Bakterien mit einer Kapsel, die sie vor direkter Opsonisierung schützt, werden entweder von mehreren Leukozyten oder zwischen Leukozyten und Gewebsoberfläche bzw. Fibrinfasern gefangen), "natural antibody" (Antikörper, die gegen Antigene wirken, mit denen der Körper noch nie Kontakt hatte), Leukokinin (hüllt die PMN-Oberfläche ein; daraus läßt sich ein Tetrapeptid, "Tuftsin", isolieren, das im Experiment die Phagozytose steigert).

Ingestion

Aufgrund der Interaktion zwischen den F_c - Rezeptoren des PMN und der opsonisierten Zelloberfläche kann Schritt für Schritt eine Umhüllung mit der Phagozytosemembran stattfinden. Die Energie für diesen Vorgang wird durch anaerobe Glykolyse bereitgestellt (151).

"respiratory burst"

Jede beliebige Störung, auch unabhängig von einer evtl. Ingestion, die auf die Membran des Neutrophilen einwirkt, kann den "respiratory burst" auslösen, der durch einen starken Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und der Aktivität im HMP-shunt (Hexose-Monophosphat-Weg) gekennzeichnet ist (115).
Der aufgenommene Sauerstoff wird über eine NADPH-abhängige Oxidase zu Superperoxid O_2^- reduziert; das extrem reaktive O_2^- - Radikal kann im NBT-Test (Nitroblautetrazolium) oder in der Chemilumineszenz gemessen werden. Superoxid (O_2^-), das aus der Phagozytenvakuole entweicht, wird mit der SOD (Superoxiddismutase) zu H_2O_2 umgewandelt, das wiederum durch das Katalase/Glutathion-Peroxidase/Glutathion-Reductase-System entgiftet wird.

Bei den genannten Reaktionen entsteht $NADP^+$, das durch den HMP (Hexosemonophosphat)-shunt regeneriert wird.

Degranulation

Granulozyten enthalten primäre und sekundäre Granula, die bei der Phagozytose mit dem gebildeten Phagosom zum Phagolysosom fusionieren. Dabei bleibt ihre Membran erhalten, aber sie geben hydrolytische kationische und peroxidierende Enzyme in die Phagozytenvakuole ab (125).

Killing

Der Mechanismus, durch den menschliche PMN's Mikroorganismen abtöten, ist noch nicht vollständig geklärt. Es werden zwei Systeme unterschieden:

- Sauerstoffabhängige Systeme: MPO (Myeloperoxidase)-abhängige, die H_2O_2 (aus dem "respiratory burst"), ein Halogen und ein saures pH benötigen; MPO-unabhängige Systeme, die zur Bildung von verschiedenen Sauerstoffverbindungen (H_2O_2, O_2^-, "Singlet Oxygen" $^1O_2$, eine Verbindung, die für jedes biologische System tödlich ist, OH-Radikale) führen. Alle aufgeführten Sauerstoffverbindungen können über eine Reihe von Reaktionen zur Emission von Photonen beitragen, was im Chemilumineszenz-Test gemessen wird (18).
- Sauerstoffunabhängige Systeme: Lysozym, Lactoferrin, Senkung des pH, nukleäre Histone, Proteasen, kationische Proteine.

Alle Schritte, die zur Phagozytose von eingedrungenen Mikroorganismen benötigt werden, können krankhaft verändert sein (44,65,79,112,126,145,148,168):

- Störung der humoralen Faktoren: Mangel an aktiven Komplementfaktoren, Immunglobulindefizienz, hemmende Serumfaktoren verschiedener Herkunft, Störung chemokinetisch und chemotaktisch wirksamer Zellprodukte (Inhibition bei Morbus Boeck, Morbus Hodgin, Lepra, Leberzirrhose), Störungen im Stoffwechsel der Mediatoren (Abbau beschleunigt oder verlangsamt)
- Faktoren, die mit Zellen interferieren: bakterielle und virale Produkte (Herpes simplex: Monozyteninhibition), GvH-Syndrom (Graft-versus-host, bei HLA-Inkompatibilität), Immunkomplex-Krankheiten (Lupus erythomathodes, chron. Polyarthritis), Tumorfaktoren (Monozyten-Chemotaxis inhibiert, Wiskott-Aldrich-Syndrom, IgA Myelom), Gabe von Colchicin, Steroiden, Chloroquin, Phenylbutazon
- Störungen der Granulozytenbeweglichkeit: Adhärenz und Verformbarkeit verändert (bei Neugeborenen, Diabetes mellitus, lazy-leukocyte-Syndrom), Migrationsdefekte, Instabilität der Zellmembran, Störungen der gerichteten Wanderung (Chemotaxis) bei Schockzuständen (Verbrennungen), Virusinfektionen (Masern), erhöhtem Alkoholgehalt im Blut, Hyper-IgE-Syndrom (96, 98) (siehe auch 2.1.2.2), bei Ichthyosis, Diabetes mellitus, chronischer Polyarthritis, chronischer Niereninsuffizienz und Hypophosphatämie (parenterale Hyperalimentation)
- "Killing"-Defekte: Chron. septische Granulomatose (NADH-Oxidase-Mangel), MPO-shunt-Defekte (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, Gluthationperoxidase-Mangel führen zu rezidivierenden Pilzinfektionen),

Steroid-, Phenylbutazon- und Sulfonamid-Therapie

- Multiple Störungen sind bei seltenen Krankheiten im Kindesalter nachgewiesen worden: Job-Syndrom, Chediak-Higashi-Steinbrinck-Syndrom (Killing- u. Degranulationsdefekt (125) (siehe 2.1.2.2).

Die hier aufgeführten Krankheiten sind größtenteils selten, ihre Therapie beschränkt sich auf die prophylaktische Gabe von Antibiotika. Einzelne Fälle konnten durch die Therapie mit Ascorbinsäure (siehe 2.1.2.2) gebessert werden (siehe Schaubild 2). Da bisher nur Teilergebnisse über die PMN-Funktion vorliegen, sollte weiter geforscht werden, um eine erfolgreiche Therapie bei vielen Krankheiten aufgrund geschwächter Abwehr zu finden. Von Bedeutung wäre dies besonders bei den iatrogen verursachten Abwehrschwächen, wie z.B. infolge von Corticoid-, Zytostatika-, Antibiotika- und Antiphlogistika-Therapie, da diese Therapieformen die neutrophilen Granulozyten stärker beeinträchtigen als das mononukleäre-phagozytäre System (91).

Table 4. Therapeutic approaches to the enhancement of the chemotactic response.

Agent	Possible mechanism(s) of action	Potential use(s) [reference(s)]
Ascorbic acid	Increase in cyclic GMP Direct effect on microtubules	Chediak-Higashi syndrome [171] Hyper-IgE–recurrent-infection syndrome [223] Repeated infections [224] Radiation-induced injury [225]
Levamisole	Increase in cyclic GMP	Hyper-IgE–recurrent-infection syndrome [11, 141, 226–229] Abnormal monocyte chemotaxis during influenza infection [88] Abnormal neutrophil chemotaxis in herpes simplex virus infection [141] Deactivation by chemoattractants [230] Hypogammaglobulinemia (IgA deficiency) [131, 132]
Lithium	Decrease in cyclic AMP Mobilization of marrow reserves	Selected patients with increased cyclic AMP [190]
Zinc	Unknown	Acrodermatitis enteropathica [136] Down's syndrome [137]
Vitamin E	Prevents oxidative damage	Deficiency of glutathione synthetase [112]
Hyaluronic acid	Unknown	Possibly numerous disorders of phagocyte chemotaxis; not studied in patients [231]
Transfer factor	Unknown	Hyper-IgE–recurrent-infection syndrome [223] Mucocutaneous candidiasis [232]
Inosiplex	Unknown	Not studied in patients [233]
Leukocyte transfusions	Replacement	Infection and debilitation (i.e., in cases involving malignancy, chemotherapy, or organ transplantation) with a documented chemotactic defect [234]

NOTE. Cyclic GMP = guanosine cyclic 3′:5′-monophosphate. Cyclic AMP = adenosine cyclic 3′:5′-monophosphate.

2. ASCORBINSÄURE UND HISTAMIN

2.1 Einleitung

2.1.1 Histamin als Mediator der allergischen Reaktion

Histamin entsteht im Körper als biogenes Amin aus Histidin unter Einwirkung einer unspezifischen L-Aminosäuren-Decarboxilase oder einer spezifischen Histamin-Decarboxilase. Der Abbau des Histamins erfolgt durch die Diaminooxidase (DAO), die S-Adenosylmethionin-Histamin-N-Methyl-Transferase und die Monoaminooxidase (MAO), die die Oxidation des Methylhistamins katalysiert. Endprodukte sind Methylimidazolessigsäure bzw. Imidazolessigsäure(-ribosid). Seine derzeit bekannte physiologische Funktion besteht darin, Entzündungsvorgänge im Körper zu regulieren. Den höchsten Histamingehalt weisen Gewebsmastzellen auf; in den basophilen Leukozyten ist er ca. 20mal niedriger, man findet auch Spuren in Thrombozyten.

Histamin wurde im Jahre 1907 zum ersten Mal chemisch synthetisiert (202) und 1910 als Mediator der Anaphylaxie erkannt (61,155). Seine Funktion bei der Auslösung allergischer Reaktionen ist heute allgemein anerkannt (47, 173). Da jedoch hierbei zahlreiche weitere Mediatoren eine Rolle spielen, brachte erst die Synthese von spezifischen Histamin-Antagonisten entscheidende Fortschritte zur Aufklärung der Histaminfunktion:

- Kontraktion der glatten Muskulatur, insbes. des Bronchialsystems, und zwar durch direkte Stimulation von H_1-Rezeptoren.
- Erweiterung der Kapillaren mit Steigerung der Permeabilität und nachfolgendem Austritt von Exsudat ins Interstitium; die größeren Gefäße verengen sich dabei. Dies kann eine Erniedrigung oder eine Erhöhung des Blutdrucks bewirken, was von der Konzentration des Histamins abhängig ist und zum Teil durch die unterschiedliche Wirkung von H_1+ H_2 - Rezeptoren erklärt

wird (29).
- Wirkung auf die Salzsäure-Produktion im Magen: Stimulation der Sekretion über H_2- Rezeptoren (29, 40).

2.1.1.1 H_1 + H_2 - Blocker

Antihistaminika wurden bereits in den 30iger Jahren synthetisiert; bis heute gibt es zahlreiche chemische Substanzen, die sich an Histamin-Rezeptoren binden. Mit der Entdeckung von Metiamide und Buriamide konnte eine ganz neue Wirkung nachgewiesen werden (40):
Die stimulierende Wirkung des Histamins auf die Salzsäure-Produktion im Magen wurde selektiv gehemmt. Dies erbrachte den Nachweis von H_2-Rezeptoren. Die klinische Prüfung von Buriamide und Metiamide zeigte eine Agranulozytose als Nebenwirkung, so daß Cimetidine als H_2 - Blocker medikamentös angewandt wurde (197).

2.1.1.2 Histamin als Regulator der PMN-Funktion

Der Einfluß des Histamins auf immunologische Zellfunktionen ist sehr vielgestaltig und wurde mit Cimetidine als Testsubstanz untersucht (189). Mehrere Untersucher postulieren das Vorkommen von H_2-Rezeptoren auf PMN's (84, 138, 189). Histamin blockiert die Freisetzung lysosomaler Enzyme in PMN's, Cimetidine hebt diese Wirkung auf (35, 137, 167). Bei der klinischen Prüfung von Metiamide und Buriamide wurde eine Neutropenie beobachtet, was in-vitro durch eine dosisabhängige Schädigung der Granulozytenprogenitoren verifiziert wurde (73). Mit Cimetidine läßt sich eine derartige Wirkung ebenfalls auslösen, allerdings liegt die verwendete Konzentration weit über der therapeutisch eingesetzten (197).

Die Chemotaxis von PMN's (siehe auch 2.2.2 und 2.4) wird durch Histamin inhibiert, die Verwendung von H_2-Blockern hebt die Inhibition wieder auf (12, 98, 110, 139, 157).

2.1.2 Ascorbinsäure

Ascorbinsäure (Vitamin C = En-diol-lacton der L-Gulonsäure) zählt zu den essentiellen Nahrungsstoffen des Menschen. Das Krankheitsbild "Skorbut" gehört zu den ersten Entdeckungen, die die beginnende naturwissenschaftlich orientierte Medizin gewann (1):
ein Prodromalstadium mit Abgeschlagenheit, Muskelschwäche, Atemnot und Depressionen, dann Auftreten von petechialen Blutungen und vorwiegend subperiostal gelegene Ekchymosen sowie Schwellungen und Blutungen der Gingiva, Störungen in der Bildung von Osteoid und Dentin, Retardierungen im Knochen- und Zahnwachstum bei Kindern und eine verzögerte Wundheilung (74, 83).

Vitamin C ist in frischem Gemüse und Früchten (Paprika, Tomaten, Zitrusfrüchte u.a.) sowie in unbehandelter Milch, Leber und Kartoffeln enthalten und gegenüber Luftsauerstoff, Oxidationsmitteln und Schwermetallspuren sehr empfindlich; die empfohlene Aufnahme/Tag beträgt 70mg für Erwachsene, 100-150mg für Schwangere und stillende Mütter (74). Die Resorption aus dem Darm geschieht wahrscheinlich in Form von Dehydroascorbinsäure (DHA) (27).

Viele Tierarten besitzen die Fähigkeit, Vitamin C aus D-Glukose zu synthetisieren; für die Primaten, das Meerschweinchen, die Insekten, die Wirbellosen und für die Fische ist es essentiell (51). Im Gegensatz zum Menschen, bei dem es 3-4 Monate dauert, bis die Symptome der Skorbut auftreten, werden beim Meerschweinchen die Mangeler-

scheinungen von Vitamin C bereits nach 3 Wochen sichtbar, weshalb es für Laborversuche besonders geeignet ist.

Die biologische Wirkung von Ascorbinsäure beruht darauf, daß sie mit der Dehydroascorbinsäure ein Redoxsystem bildet, das bei Hydroxilierungs- und Dioxigenase-Reaktionen eine Rolle spielt:
Hydroxilierung von Prolin und Serin (Teilreaktion der Kollagensynthese, bei Störung zeigen sich klassische Skorbutsymptome), Bildung von Noradrenalin aus Dopamin, Umwandlung Folsäure/Tetrahydrofolsäure, Synthese der Nebennierenrindensteroide, Abbau zyklischer Aminosäuren, Beteiligung an O-Methylierungsvorgängen, Synthese von Mukopolysacchariden (74, 83, 110).
Außerdem steigert Ascorbat die Resorption von Eisen aus dem Darm und übt eine wichtige Schutzfunktion für andere Redoxsysteme (Thiamin, Riboflavin, Biotin, Folsäure, Vit. A und Vit. E) aus.

2.1.2.1 Ascorbinsäure und Immunsystem

Die Anwendung von Ascorbinsäure zur Stimulation des Immunsystems ist sehr umstritten. Es wurde zum Teil eine Einnahme in massivsten Dosen propagiert (135). Doch sollten bei der therapeutischen Verwendung zunächst Untersuchungen berücksichtigt werden, die nachprüfbare Fakten enthalten (Übersichtsarbeiten: 8, 108, 139, 184).

Es konnten folgende Ergebnisse durch in-vitro-Experimente gewonnen werden:
- Steigerung der Interferonproduktion in Zellkulturen (108)
- Steigerung der Blastogenese von menschlichen T-Zell-Kulturen (108)

- Steigerung des Gehalts an intrazellulären Nucleotiden (speziell der cGMP) (10, 132: in PMN's, 160: in mononucleären Leukozyten)
- keine Änderung der Motilität von Lymphozyten (171,13)
- keinen Einfluß auf die mitogen-induzierte Lymphozytentransformation, die intrazelluläre Proteinsynthese in Lymphozyten, die aktive Bildung der E-Rosetten von Lymphozyten (13)
- Erhöhung des LIF (Leukocyte inhibiting factor) (13).

2.1.2.2 Ascorbinsäure und PMN-Funktion

Viele Schritte sind notwendig, bis der neutrophile Granulozyt eingedrungene Mikroorganismen aufnehmen und abtöten kann (siehe auch 1.3). Die Ascorbatkonzentration im neutrophilen Granulozyten (PMN) ist 20-40 mal höher als im umgebenden Plasma (63, 176) Diese Tatsache läßt vermuten, daß Ascorbinsäure im Granulozyten eine wichtige Rolle spielt. Die genaue Funktion ist noch unbekannt, doch liegen experimentelle Hinweise vor, daß Ascorbinsäure in einigen Fällen die gestörte Granulozytenfunktion verbessern bzw. wieder herstellen kann:

- bei experimenteller Skorbut von Meerschweinchen war die Phagozytosefähigkeit eingeschränkt und konnte durch Vitamin C behoben werden (151)
- durch Cortison induzierte Störungen der PMN-Funktion konnten mit Ascorbinsäure korrigiert werden (57)
- beim Chediak-Higashi-Steinbrinck-Syndrom bessert Vit.C den Krankheitsverlauf (38, 146) Einige Autoren konnten keine Besserung feststellen (81)
- ebenso wird über die erfolgreiche Anwendung bei der chronischen septischen Granulomatose berichtet (9)

- bei Patienten, die an häufig wiederkehrenden Infektionen litten, konnte mit Ascorbinsäure eine Besserung erzielt werden (11, 134). Es wurden jedoch auch Fälle berichtet, bei denen Ascorbat die gestörte Chemotaxis in-vitro besserte und die klinische Anwendung keinen Erfolg brachte (65)
- bei Patienten, die vor und nach großen chirurgischen Eingriffen untersucht wurden, konnte keine Relation zwischen der postoperativen Abnahme der Ascorbatkonzentration im Plasma und der Phagozytoseaktivität von PMN's festgestellt werden (68)
- die durch Bestrahlung verursachten Schäden konnten unter Ascorbinsäure-Therapie vermindert werden (179)
- beim Hyper-IgE-Syndrom mit chron.rezidivierenden Infekten zeigt die Ascorbinsäure-Prophylaxe eine klinische Besserung (11, 76)

In-vitro-Experimente mit Ascorbinsäure an PMN's ergaben:

- eine Stimulation des HMP-shunt (Hexosemonophosphat-Weg) (88)
- eine Steigerung der postphagozytären Stoffwechselaktivität (7)
- eine Erhöhung intrazellulärer zyklischer Nucleotide (10, 132)
- eine Stimulation der Chemotaxis (10,37,38,62 (Stimulation nur in hohen Dosen, bei niedriger Dosis keine Änderung), 65,81,87,88,143,150)
- keine Änderung der Chemotaxis (93)
- keine Änderung des "Killings" bei 200mg Ascorbat/d; Verminderung der Killing-Kapazität bei 2g/d (164)

- bei Meerschweinchen mit experimentell erzeugter Skorbut zeigen die Leukozyten eine eingeschränkte bakterizide Aktivität, eine Erniedrigung der durch Phagozytose ausgelösten Glykolyse und des HMP-shunts (163); die phagozytäre NADPH-Oxidase-Aktivität ist reduziert (162).

Zunächst wurde angenommen, daß die Ascorbinsäure selbst bzw. ihre Derivate zytotoxisch wirken, und somit für das intrazelluläre Killing verantwortlich sind (119, 142). Neuere Untersuchungen widerlegen diese Vermutung (108, 178, 204). Einige in-vitro-Versuche sprechen für eine zytotoxische Wirkung des Ascorbats in Gegenwart von Metallen (17, 60). Die dabei gewählten Versuchsbedingungen entsprechen jedoch nicht den physiologischen Verhältnissen beim Menschen.

2.1.2.3 Ascorbinsäure und Histaminabbau

Bei einigen Vertebraten ist Ascorbinsäure für den Abbau von Histamin zu Hydantoinacetat verantwortlich (1). Verschiedene Experimente sprechen dafür, daß Ascorbinsäure in engem Zusammenhang mit dem Histaminstoffwechsel, insbesondere der Entgiftung von Histamin, steht:

- eine experimentelle Skorbut bei Meerschweinchen führte zu einem Anstieg der Plasma-Histamin-Konzentration, was durch Supplementierung von Ascorbinsäure ausgeglichen wurde (52). Ebenso konnte der erhöhte Gewebshistamingehalt durch eine einmalige Ascorbatgabe normalisiert werden (52)
- die Ascorbatproduktion bei Ratten, deren Histaminspiegel durch Stimulantien experimentell erhöht wurde, verstärkte sich deutlich (183)

- Meerschweinchen hatten unter Streßbedingungen einen erhöhten Blut-Histaminspiegel, der durch Ascorbat gesenkt werden konnte (123)
- die Anaphylaxie-Mortalität war bei Vitamin C supplementierten Mäusen um 44% niedriger als bei der Vergleichsgruppe; der Anaphylaxie-induzierte Histaminanstieg im Lungen- und Milzgewebe war bei der behandelten Gruppe geringer als bei der unbehandelten (109)
- im Tierversuch führen wiederholte Histamingaben zu einer deutlichen Senkung des Ascorbatgehalts der Nebennierenrinde (151)
- der Histamin-induzierte Bronchospasmus wird durch Ascorbat aufgehoben (210), während der Antigen-induzierte Bronchospasmus davon unbeeinflußt bleibt (104).

Weitere klinische Beobachtungen beim Menschen sprechen für die oben angeführte Hypothese:

- es besteht eine Korrelation zwischen erniedrigter Ascorbatkonzentration in Plasma, Urin und Leukozyten und einer erhöhten Histaminkonzentration im Blut (22, 67, 151)
- Patienten mit Asthma bronchiale sowie Patienten, die über längere Zeit mit Steroiden behandelt wurden, weisen einen reduzierten Ascorbatgehalt in Plasma und Leukozyten auf (129, 184).

Einige Autoren ziehen hieraus den Schluß, daß Ascorbinsäure infolge seiner Fähigkeit, ein Redoxsystem zusammen mit Glutathion zu bilden (16, 22), die Zelle gegen diejenigen Sauerstoffradikale schützt ("Scavenger of singlet oxygen" (31, 108, 178)), die bei der Aktivierung des PMN durch Histamin entstehen (131). Es gibt allerdings auch einen Modellversuch, der gegen die Hypothese von der antioxidativen Funktion des Ascorbats spricht (204). Möglicherweise wird diese Schutzfunktion indirekt via Katalase/Dehydroascorbat-Reduktase ausgeübt (20,177).

Eine weitere interessante Beobachtung wurde bei Graviden und Neugeborenen gemacht: es bestand eine enge Korrelation zwischen der erhöhten Ascorbatkonzentration im Nabelschnurblut (1,5 - 2,7 mal mehr als im Cubitalblut der Mutter), dem Histaminspiegel und dem Gehalt an bestimmten Prostaglandinen (PGE_2, PGF_2) (159). In-vitro-Experimente (160) und weitere Untersuchungen an Schwangeren (161) führen zu der Hypothese, daß Ascorbinsäure über eine Erhöhung zellulärer zyklischer Nucleotide (10, 132) die Abgabe von Prostaglandinen kontrolliert (160) oder möglicherweise die Differenzierung der Prostaglandine via Histamin beeinflußt (161).

Der Einfluß von Ascorbat auf Histaminspiegel und Prostaglandinsynthese könnte auch die klinischen Beobachtungen erklären, wonach ein erniedrigter Ascorbatspiegel die Blutkonzentration von Cholesterin erhöht, zu Arteriosklerose prädisponiert, die Häufigkeit von Herzattacken erhöht und eine frühzeitige Placentalösung begünstigt (2). Diese Beobachtungen lassen sich aber auch aus einer anderen, durch Versuche gestützten Hypothese herleiten: Ascorbinsäure übt eine Schutzfunktion gegen die Oxidation von Phosphatidylcholinen aus (127) (ähnlich wie Vit. E, Thiole und verschiedene Amine), was einen Schutz gegenüber Alterungsprozessen darstellen würde.

2.1.3 Problemstellung

Es sollte in den vorliegenden Experimenten untersucht werden, ob Histamin die Granulozytenfunktion beeinflußt und ob Ascorbat Histamin-bedingte Veränderungen aufhebt. Wenn Ascorbat direkte oder indirekte Histaminwirkungen antagonisiert, ließe sich die Hypothese von der Detoxifikation des Histamins via Schutz gegen O_2-Derivate(183) oder via Steuerung der Prostaglandine (160, 161) stützen.

Um die genauen Zusammenhänge in einem kleinen Teilbereich zu klären, wurden 3 Parameter untersucht:

- Chemotaxis (Stimulation der PMN's durch N-f-Met-Leu-Phe), Inkubation mit Histamin, Inkubation mit Histamin + Cimetidine (als H_2- Blocker Indikator für spezifisch H_2-Histamin-bedingten Veränderungen); in einem zweiten Schritt: Inkubation mit Histamin + Ascorbat
- Chemilumineszenz: Inkubation mit Histamin, anschließend Stimulation mit opsonisiertem Zymosan
- Bestimmung des intrazellulären Ascorbatgehalts in Beziehung zur extrazellulären Histaminkonzentration, Nachweis von Histamin-bedingten Veränderungen durch zusätzliche Mitinkubation von Cimetidine (H_2-Blocker) bzw. Diphenhydramin (H_1-Blocker).

Bei zahlreichen Krankheiten ist der Histaminspiegel erhöht (Allergosen, Ulcus ventriculi, Ulcus duodeni, Hyper-IgE-Syndrom mit rezidivierenden Infektionen). Die These von der "Histamindetoxifikation" durch Ascorbat ergäbe einen Ansatzpunkt für eine begründbare Therapie. Sehr wahrscheinlich ist allerdings, daß die Ascorbinsäure hier nur einen Teil eines sehr komplexen Systems darstellt, und daß die pure Substitution keine rationale Therapie wäre.

2.2 Methoden

2.2.1 Granulozytenisolierung

Für alle Versuche wurden die Granulozyten aus dem Vollblut gesunder Spender mittels eines Percoll-Gradienten isoliert (157).

MATERIALIEN und GERÄTE

Blutentnahme von gesunden Spendern:

8 ml EDTA-Blut für Chemotaxis (2.2.2)
4 ml EDTA-Blut für Chemilumineszenz (2.2.3)
50ml Heparin-Blut für Bestimmung des intrazellulären Ascorbats (25 000 i.E. Heparin) (2.2.4)

- EDTA-di-Kalium-Röhrchen, 4 ml, Greiner, Stuttgart/BRD
- Heparin Na, Medac, Hamburg/BRD
- Percoll, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala/Schweden
- Isotone NaCl-Lösung zur i.v. Infus., Nr. 3508, Braun, Melsungen/BRD
- Refraktometer 90163, C.Zeiss KG, Oberkochen/BRD
- Zentrifuge: Cryofuge 6-6, Hereaeus-Christ, Leonberg/BRD
- NaCl, analytisch, rein, Nr. 6404, KCl, analytisch, rein Nr. 4936, $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$, analytisch, Nr. 6580, KH_2PO_4, analytisch, Nr. 4873, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, analytisch, Nr. 5833, $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, analytisch, Nr. 2382, Merck, Darmstadt/BRD
- Ampuwa^R, Braun, Melsungen/BRD
- EDTA Titriplex III, Nr. 8418, NH_4Cl, analytisch, rein, Nr. 1145, $KHCO_3$, analytisch, rein, Nr. 4854, Merck, Darmstadt/BRD
- Trypanblaulösung 5% in physiol. NaCl, Serva, Heidelberg/BRD
- Neugebauer-Zählkammer
- Coulter-Counter-plus S, Coulter Electronics, Krefeld

I. Herstellung der Percoll-Lösungen und des Lysemediums

Percoll-Lösung für Chemilumineszenz-Isolierung (vgl. 2.2.3)

- 70% - Percoll: mit isotoner NaCl-Lösung verdünnen, im Refraktometer auf n_D^{20} = 1.3477 (Gradient A) bzw. auf n_D^{20} = 1.3468 (Gradient B) einstellen.
- 55% - Percoll: mit NaCl-Lösung verdünnen, auf n_D^{20} = 1.3450 (Gradient A und B) einstellen.

Percoll-Läsung für Chemotaxis-Versuche und zur Bestimmung des intrazellulären Ascorbats (vgl. 2.2.2 bzw. 2.2.4)

- 100% Percoll-Salz-Lösung: 500 ml Percoll mit 4000 mg NaCl, 100 mg KCl, 575 mg $Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 100 mg KH_2PO_4, 50 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 50 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ mischen; solange rühren, bis alle Salze vollständig gelöst sind (Dauer ca. 1/2 h)
- 70% Percoll: Salz-Lösung mit physiol. NaCl-Lösung verdünnen, im Refraktometer auf n_D^{20} = 1.3474 einstellen
- 55% Percoll: entsprechend verdünnen, auf n_D^{20} = 1.3447 einstellen.

Die Percoll-Lösungen wurden nach der Herstellung in sterile Vorratsgefäße abgefüllt, bei 4° C aufbewahrt und innerhalb von 6 Wochen verbraucht; trübe Lösungen sowie Lösungen, deren pH-Wert vom Ausgangswert um mehr als 0.2 abwich, wurden nicht mehr verwendet, da derartige Veränderungen Zeichen für eine Keimbesiedlung sind.

Lysemedium: 1 l H_2O bidest. mit 8.3 g NH_4Cl, 37 mg EDTA und 1 g $KHCO_3$ versetzen und bei 4° C aufbewahren.

II. Isolierung der Granulozyten für Chemilumineszenz-Versuche

6 Polystyrol-Röhrchen zu je 4 ml wurden mit 1 ml 70% Percoll gefüllt (je 3 für Gradient A bzw. B), mit 1 ml 55% Percoll vorsichtig überschichtet und pro Röhrchen 0.5 ml EDTA-Blut sehr vorsichtig auf die Gradienten aufgetragen, um eine Vermischung der Schichten zu vermeiden. Danach erfolgte die Zentrifugation (18° C, 10 Min. 250 g, Auslauf ungebremst). An der Trennschicht zwischen den zwei unterschiedlich dichten Percoll-Gradienten bildet sich eine Granulozytenbande, die sehr deutlich von der Monozytenfraktion (oberhalb des 55% - Gradienten), den Erythrozyten (am unteren Ende des Röhrchens) und dem thrombozytenreichen Plasma (oben) getrennt ist.

Nach Entfernung des Überstandes wurde die Granulozytenbande vorsichtig abgesaugt, mit 0.9 %iger NaCl - Lösung gewaschen und nochmals zentrifugiert (5 Min., 250 g). Die gesamte Isolierung dauerte ca. 30 Min.

Zur weiteren Verwendung des Zellpellets siehe 2.2.3

III. Isolierung für Chemotaxis-Versuche (2.2.2) und Bestimmung des intrazellulären Ascorbats (2.2.4)

In 15 ml - Polystyrolröhrchen wurden 4 ml 70% Percoll-NaCl-Lösung vorgelegt und vorsichtig mit 4 ml 55% Percoll-NaCl-Lösung überschichtet (4 Röhrchen für 2.2.2, 12 Röhrchen für 2.2.4). Darauf wurden 4 ml EDTA-Blut bzw. 4 ml Heparin-Blut aufgetragen (für 2.2.2 bzw. 2.2.4).

Die Gradienten wurden zentrifugiert (250 g, 20 Min., 18° C, Auslauf ungebremst) und die thrombozytenreiche Plasmafraktion entnommen (für 2.2.4). Die Granulozytenbande, die sich zwischen den zwei Gradienten bildet, wurde nach Verwerfen des Überstandes vorsichtig abgesaugt und in Röhrchen mit vorgelegtem kalten (4°) Lysemedium gegeben (2.2.2 in 2 Röhrchen à 15 ml, 2.2.4 in 2 verschließbare 50 ml-Polystyrolröhrchen). Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (250 g, 5 Min.), das resultierende Zellpellet in kalter (4°C) 0.9 %iger Na-Cl-Lösung gewaschen, danach wieder zentrifugiert (250 g, 5 Min.) und gewaschen und nochmals zentrifugiert (250 g, 5 Min.).

IV. Kontrollen

Bei 16 Blutentnahmen wurden zur Bestimmung der Leukozyten- und Thrombozytenzahl 2 ml EDTA-Blut zusätzlich entnommen.(Coulter-Counter plus S/Routinelabor der Chirurg. Universitätsklinik Tübingen). Die Ausbeute wurde ermittelt durch Vergleich zwischen der Leukozytenzahl im Vollblut und der Anzahl der erhaltenen Leukozyten im Zellpellet.

Reinheit: Proben aus dem Zellpellet wurden in EDTA-Plasma resuspendiert und im Routinelabor gefärbt und ausdifferenziert.

Zur Kontrolle auf Thrombozytenverunreinigungen wurden aus den Zellpellets Proben entnommen und im Routinelabor automatisch ausgezählt.

Vitalität: Zellpellet-Proben wurden mit Trypanblau gefärbt und in der Neugebauer-Kammer mindestens 16 Felder ausgezählt (keine Anfärbung: vitale Zellen, Anfärbung: geschädigte Zellen).

2.2.2 Chemotaxis

"Chemotaxis" bezeichnet die gerichtete Bewegung einer Zelle auf einen chemischen Stimulus zu (79). Davon unterschieden wird die zufällige Bewegung (random migration), d.h. die nicht gerichtete Bewegung von Zellen infolge eines chemischen Reizes (172).

BOYDEN beschrieb im Jahre 1962 eine Technik zur experimentellen Beobachtung der Chemotaxis und Chemokinese (36). Seitdem sind viele Erkenntnisse über die Physiologie und Biochemie der Chemotaxis hinzugekommen; das Thema wird in verschiedenen Monographien (80, 201) und zahlreichen Übersichtsarbeiten (26, 79, 168, 172, 206) behandelt.

Einzelne Methoden ermöglichen die selektive Untersuchung der Chemotaxis (leading-front-method) (207) oder der Chemokinese (169). In den vorliegenden Versuchen wurde eine Modifikation der klassischen Boyden-Technik angewandt; die nachfolgend beschriebenen Versuche sind in Zusammenarbeit mit Herrn OBERRITTER, H., Labor der Chirurg. Universitätsklinik Tübingen, durchgeführt worden.

Versuchsreihe A

Nach Vorinkubation mit Histamin (1/2 h) wurden die Granulozyten abzentrifugiert und mit Medium resuspendiert (unter Berücksichtigung physiologischer (30 - 120 ng/ml) und pathologischer (500 ng/ml (97) Histaminkonzentrationen). Die so vorbehandelten Zellen wurden mit einem Standard-Chemotaktikum in Boyden-Kammern stimuliert und die Ergebnisse mit denen unvorbehandelter, d.h. nur mit Medium vorinkubierter Zellen verglichen.

Versuchsreihe B

Zur Überprüfung eines H_2 - spezifischen Einflusses wurden die Zellen mit Histamin (500 ng/ml) und Cimetidine vorinkubiert.

Versuchsreihe C

Analog zum obigen Vorgehen wurden Zellen mit Histamin + Ascorbat 1/2 h vorinkubiert (Ascorbatkonzentration 1.6 mg% = physiol. Bereich (129) bis 16 mg%; parallel zur steigenden Histaminkonzentration).

MATERIALIEN und GERÄTE

13 gesunde Spender aus dem Labor der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen nahmen an den Versuchen teil (6 weibl., 7 männl., Durchschnittalter 29 Jahre) und spendeten 22 Proben zu je 8 ml EDTA-Blut, die auf die verschiedenen Versuchsreihen verteilt wurden: 18 Versuche zu A, 13 zu B, 16 zu C. Die Blutentnahmen fanden jeweils um 10.00 Uhr vormittags statt.

zu I:

- Ampuwa^R pro injectione, Braun, Melsungen/BRD
- Dulbeccos MEM für die Chemilumineszenz, mit Hepes, ohne Glutamin, ohne Phenolrot, steril, Nr. 607 789, Boehringer, Mannheim/BRD
- Humanserumalbumin, lyophilisiert, ORHA 20/21, Behringwerke, Marburg/BRD
- Histamine free base cryst. H 7152, Sigma, St.Louis/USA
- L + Ascorbinsäure fein, gepulvert, Nr. 50078, Merck, Darmstadt/BRD

- Cimetidine crystalline C 4522, Sigma, St. Louis/USA
- Chemotaktikum: N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine F 3506, Sigma, St. Louis/USA

zu II:

- Boyden-Kammern, Nucleopore, Tübingen/BRD
- 7-X-Lösung, Serva, Heidelberg/BRD
- Filter 13 mm x 3 µm, Nucleopore, Tübingen/BRD
- handelsübliche Büro-Haftetiketten

zu IV:

- ai 134 Cellcounter, Dilab, Karlsruhe/BRD
- Inkubator: Melag, Berlin/BRD

zu V:

- BM-Test-Simplet^{R} für Differential-Blutbild, Boehringer, Mannheim/BRD
- Mikroskop mit Ölimmersion, C.Zeiss KG, Oberkochen/BRD

I. Herstellen von Stammlösungen

Medium: Dulbeccos MEM + 0,1% Humanalbumin

- Histamin: 10 mg Histamin in 100 ml H_2O bidest. lösen $\hat{=}$ 0,1 mg/ml = Lösung A
- Ascorbat: 40 mg Ascorbinsäure auf 25 ml H_2O bid. $\hat{=}$ 1,6 mg/ml = Lösung B
- Cimetidine: 25,2 mg Cimetidine auf 10 ml H_2O bid. $\hat{=}$ 10^{-2} mol = Lösung C
- Chemotaktikum: Stammlösung 10^{-4} mol (bei - 20^{o} C aufbewahrt) auf 10^{-6} mol verdünnen: 0,25 ml auf 25 ml Medium

II. Versuchsvorbereitung

Das nach 2.2.1 erhaltene Zellpellet wurde mit den Versuchslösungen so verdünnt, daß eine Endkonzentration von 0.9 - 1.2 x 10^6 Zellen/ml resultierte. Bei evtl. Verzögerungen wurden die Zellen max. 1/2 h in Eis aufbewahrt. Die Boyden-Kammern (pro Versuchsbedingung mind. 2 Kammern) wurden mit 5%iger 7-X-Lösung gereinigt, mehrmals in H_2O, dann in H_2O bidest. gespült, zum Schluß mit Preßluft ausgeblasen und mit 1,2 - 1,4 ml Medium (Kontrolle) oder Chemotaktikum gefüllt (durch das kleine Loch vorsichtig einpipettieren, bis sich der Flüssigkeitsspiegel im unteren Teil der Versuchskammer konvex wölbt). Die Nucleopore-Filter wurden mit der Pinzette aus der Verpackung genommen und so in die Versuchskammer eingelegt, daß der untere Teil vollständig und ohne Einschluß von Luftblasen abgedeckt war. Beide Löcher wurden mit Haftetiketten verschlossen.

III. Vorinkubation

Versuchsreihe A

Herstellen von verschiedenen Histaminkonzentrationen:

0,10 ml Lösung A auf 10 ml ≙ 1000 ng Hist./ml, davon 5,00 ml auf 5,00 ml Medium ≙ 500 ng Hist./ml
0,015 ml Lösung A auf 5 ml Medium ≙ 300 ng Hist./ml, davon 1,5 ml auf 3 ml Medium ≙ 100 ng Hist./ml

Leerwert: 5 ml Medium

Der aus der Isolation (2.2.1) erhaltene Zellpellet wurde mit 0,5 ml Medium resuspendiert, in 5 Teile à 0,1 ml aufgeteilt und diese dann mit 5 ml Medium (Leerwert) bzw. den verschiedenen Histaminkonzentrationen aufgefüllt.

Nach Verschluß mit Parafilm^{R} erfolgte die Vorinkubation (37^{o} C - 30 Min.).

Versuchsreihe B

- Herstellen von verschiedenen Cimetidinekonzentrationen:

  1,0 ml Lösung B auf 9 ml Medium ≙ Cimetidine 10^{-3} mol,
  1 : 10 verdünnen (1 ml auf 9 ml Medium) ≙ Cim. 10^{-4}mol,
  1 : 10 verdünnen (1 ml auf 9 ml Medium) ≙ Cim. 10^{-5}mol.

- von den verschiedenen Cimetidinekonzentrationen je 5 ml entnehmen und je 0,025 ml Lösung A zugeben (≙ 500 ng/ml Histamin)
- 0,025 ml Lösung A auf 5 ml Medium (≙ 500 mg/ml Hist.)
- Leerwert: 5 ml Medium
- Vorinkubation: wie bei Versuchsreihe A

Versuchsreihe C

- Herstellen der Ascorbat-/Histaminkonzentrationen:
  0,05 ml Lösung B + 0,005 ml Lsg. A auf 4,95 ml Medium
  ≙ 1,6 mg% Ascorbat + 100 ng/ml Histamin

  0,15 ml Lsg. B + 0,015 ml Lsg. A auf 4,84 ml Medium
  ≙ 4,8 mg% Ascorbat + 300 ng/ml Histamin

  0,25 ml Lsg. B + 0,025 ml Lsg. A auf 4,72 ml Medium
  ≙ 8 mg% Ascorbat + 500 ng/ml Histamin

  0,5 ml Lsg. B + 0,05 ml Lsg. A auf 4,45 ml Medium
  ≙ 16 mg% Ascorbat + 1000 ng/ml Histamin

- Leerwert: 5 ml Medium
- Vorinkubation: wie bei Versuchsreihe A

IV. Inkubation in der Boyden-Kammer

Nach Vorinkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (250 g, 5 Min.) und der Zellpellet mit soviel Medium suspendiert, daß eine Konzentration von 0,9 - 1,2 x 10^6 Zellen/ml erreicht wurde (Kontrolle im Cell-Counter). Von der Zellsuspension wurden 0,2 ml in die Versuchskammern zugegeben und diese sofort mit einer Haftetikette verschlossen. Danach erfolgte die Inkubation bei 37^o C für 30 Min.

V. Versuchsauswertung

Die Zellsuspension auf dem Filter wurde mit einem Wattetupfer nach Ende der Inkubationszeit abgesaugt, die Kammern wieder verschlossen und mit einer langen, gebogenen Kanüle durch die kleinere Öffnung die Versuchsflüssigkeit abgesaugt. Der Filter wurde mit einer gebogenen Pinzette sehr vorsichtig aus der Kammer herausgenommen, umgedreht auf einen Färbe-Objektträger gelegt und mit einem Deckglas abgedeckt.
Nach 15 Min. wurden die gefärbten Filter mit dem Ölimmersionsobjektiv (Vergrößerung 12 x 65) ausgewertet: richtige Ebene sichtbar, wenn Filterporen als schwarze Löcher erscheinen; 10 Objektfelder auszählen, dabei nur die zentral gelegenen Zellen berücksichtigen (starke Ansammlungen am Rand nicht werten), auf intakte Zellen achten.
Aus den zwei Werten, die sich aus einem Versuchsansatz ergaben, wurde das arithmetische Mittel gebildet und der CT-Faktor durch Vergleich mit dem Leerwert errechnet (Leerwert = Zellen, die auf der unteren Filterseite durch Medium stimuliert wurden).

$$\text{CT - Faktor} = \frac{\text{Zahl der gewanderten Zellen}}{\text{Zahl der gewanderten Zellen bei Leerwert (Kontrolle)}}$$

VI. Methoden - Fehler

Es wurden nur die Versuche ausgewertet, bei denen die Zahl der Zellen/Gesichtsfeld bei der Kontrolle (Leerwert) weniger als durchschnittlich 4.0 betrug. Ein deutlicher chemotaktischer Effekt besteht erst ab einem CT- Faktor von 2.0 . Der durchschnittliche Fehler bei der Bestimmung des CT- Faktors wurde durch Vergleich der zwei Einzelergebnisse ermittelt (siehe auch 3.4).

VII. Statistische Auswertung

Die gewählte Versuchsanordnung entspricht dem mathematischen Modell von mehreren verbundenen Stichproben aus einer Grundgesamtheit. Als gemeinsames Merkmal der Stichproben ist eine hypothetische Grundaktivität der Granulozyten anzunehmen, die individuell variabel ist. Die Grundgesamtheit bestehe aus der CT-Aktivität aller Granulozyten von gesunden Probanden. Sie sei parametrisch im Sinne einer Gauß-Verteilung. Zur statistischen Auswertung eignen sich daher der T-Test für paarige Sichproben oder die Varianzanalyse für mehrere verbundene Merkmale.

2.2.3 Chemilumineszenz

Im Jahre 1972 beobachtete Allen, daß PMN's während der Phagozytose Photonen aussenden (6). Diese Photonen werden erzeugt, wenn die während des "respiratory burst" und des "microbial killing" (siehe 1.4) entstehenden Moleküle (z.B. das O_2^- - Radikal (149)) aus dem angeregten ("excited") Zustand wieder in den Normalzustand zurückkehren (54, 72). Das dabei emittierte Signal ist allerdings sehr schwach; es sind daher sehr viele Zellen (10^9) nötig, um den Effekt messen zu können. Zusätzlich wird die Auswertung dadurch erschwert, daß das ausgesendete Licht über das ganze Spektrum verteilt ist, weil es aus unterschiedlichen Reaktionen stammt. Die "natürliche" Chemilumineszenz kann durch die Verwendung von Luminol (5-amino-2,3-dihydrophtalazin-1,4-dion), 10,10'-dimethyl-9,9'-biacridinium-dinitrat (DBA) oder Lucigenin als Chemilumineszenz-Indikatoren effektiver gemessen werden: Sie verstärken die Lichtemission in einem schmalen Frequenzband um ein Vielfaches (Luminol: Faktor 1000 (5)). Dadurch sinkt die Zahl der benötigten Zellen auf $3 \cdot 10^5$/ml und die Methode wird sehr empfindlich.

Der NBT (Nitroblautetrazolium)-Reduktionstest, der seither als das Standardverfahren zur Beurteilung des oxidativen Soffwechsels von neutrophilen Granulozyten galt (143), wird heute vielfach durch die Chemilumineszenz-Methode ersetzt (6, 94). Die bakterizide Kapazität von PMN's und das Chemilumineszenz-Signal sind eng miteinander korreliert (4, 89), daher wird mit der Chemilumineszenz diese Kapazität heute vielfach gemessen (23, 69, 180).

Im Labor der Chirurg. Universitätsklinik Tübingen wurde die Methode weiterentwickelt und optimiert (43) und bei den vorliegenden Versuchen verwendet. Die isolierten Granulozyten wurden im Biolumaten mit Histamin 10 Min. (V 1 - 3) bzw. 30 Min. (V 4 - 6) vorinkubiert, dann opsonisiertes Zymosan zugegeben und die Reaktion über 1/2 h beobachtet.

Nachfolgende Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn H. OBERRITTER, Labor der Chirurg. Univ.Klinik Tübingen, durchgeführt.

MATERIALIEN und GERÄTE

Von 6 gesunden Spendern (4 weibl., 2 männl.) wurde 4 ml EDTA-Blut entnommen und die Granulozyten sofort isoliert (s. 2.2.1). Entnahmezeit: 10^{00} Uhr.

zu I:

- Seromed^{R} PBS Dulbecco mit Ca^{++} und Mg^{++}, Biochrom KG, Berlin/BRD
- Humanalbumin ORHA 20/21, Behringwerke Marburg/BRD
- Glukose, analytisch rein, Merck, Darmstadt/BRD
- Zymosan A from S. cerevisiae yeast, Sigma, St.Louis/USA
- NaCl - isotone NaCl-Lösung zur i.v.Infus., Braun, Melsungen/BRD
- Histamine free base crystall. H 7152, Sigma, St.Louis, USA
- Potter-Elvehjem-Glas 100 ml, C.Erbe, Tübingen/BRD

zu II:

- ai 134 Cellcounter, Dilab, Karlsruhe/BRD
- Sterilfilter FP 030/3, Ø 0,2 µm, Schleicher und Schüll, Hamburg/BRD

zu III:

- Luminol: 10^{-3} mol Luminol, Lumac, Basel/Schweiz; mit H_2O bidest. (Ampuwa^R pro injectione, Braun, Melsungen/BRD) auf 2 . 10^{-4} mol verdünnt
- Biolumat LB 9505, Bertholt, Wildbad/BRD
- 43-Zeilen-Schreiber (DOT-Printer MX-82 F/T), Epson

I. Herstellen von Stammlösungen und Medien

- Puffer: Seromed^R PBS Dulbecco mit Ca^{++} und Mg^{++} + 0,1% Humanalbumin + 0,1% Glukose
- Opsonisiertes Zymosan: 600 mg Zymosan in 60 ml 0,9% NaCl auflösen, über Nacht rühren, anschließend im Potter-Elvehjem-Gefäß homogenisieren.
  Danach wurde die Suspension zentrifugiert (10 Min., 2000 g) und mit frischem Serum (aus der Blutbank der Univers.Klin.Tübingen) inkubiert (30 Min. 37° C).
  Es folgte eine zweite Zentrifugation; der daraus erhaltene Zellpellet von opsonisiertem Zymosan wurde mit 12 ml 0,9% NaCl resuspendiert. Die Suspension wurde in Proben zu 0,15 ml abgefüllt und bei - 20° C aufbewahrt.
- Histamin: 67 mg Hist. in 100 ml H_2O bidest. lösen; davon 1 ml auf 99 ml Puffer = H I (≙ 6,7 ug/ml HI) auf 9 ml Puffer = H II (≙ 670 ng/ml)

II. Versuchsvorbereitung

Die aus der Granulozytenisolation erhaltene Zellsuspension wurde durch Verdünnung mit Puffer auf eine Konzentration von 3 . 10^5 Zellen/ml eingestellt, das entspricht einer Endkonzentration von 4,5 . 10^4 Zellen/ml

im Versuchsansatz. Der Puffer wurde unmittelbar vor Gebrauch steril filtriert.

III Versuchsdurchführung

In die Kammern des Biolumaten wurden nach dem unten stehenden Schema die Versuchsansätze einpipettiert, je 0,1 ml der Zellsuspension eingesetzt ($3 \cdot 10^4$ Zellen), die Reaktion über 10 Min. (V 1 - 3) bzw. 30 Min. (V 4 - 6) beobachtet und dann 0,02 ml opsonisiertes Zymosan zugegeben (bei Kammer 2: keine Zymosanzugabe). Im Computer wurden die in der folgenden halben Stunde einfallenden Signale gespeichert und ausgewertet.

P i p e t t i e r s c h e m a

Mengen in µl

Nr.	Puffer	H I	H II	Luminol	
1	500	---	---	50	Leerwert
2	470	---	50	50	Hist. 500 ng/ml
3	450	50	---	50	ohne Zymosan Hist. 50 ng/ml
4	400	100	---	50	Hist. 100 ng/ml
5	450	---	50	50	Hist. 500 ng/ml
6	400	---	100	50	Hist.1000 ng/ml

2.2.4 Bestimmung des intrazellulären Ascorbats

Die isolierten Zellen wurden mit Histamin bzw. mit Histamin und H_2/H_1-Blockern inkubiert, sofort lysiert, die erhaltenen Proben bei - 20° C aufbewahrt und der Ascorbatgehalt innerhalb von 5 Tagen bestimmt.

Die Histaminkonzentrationen sind unter Berücksichtigung des physiologischen Bereiches (30 - 120 ng/ml) und der pathologischen Werte (500 ng/ml (97)) gewählt. Die hier verwendete Cimetidine-Konzentration liegt zwar um den Faktor 100 über den Blutkonzentrationen, die bei der Therapie erreicht werden (1 µg/ml = $4 \cdot 10^{-6}$ mol (32, 197)), doch ist 10^{-4} die übliche in-vitro-Konzentration, bei der eine beobachtete Wirkung auf ihre H_2-Spezifität hin beurteilt werden kann (73, 96, 98, 133).

MATERIALIEN und GERÄTE

Pro Versuchsreihe wurde von gesunden Spendern 50 ml Heparinblut entnommen (45 ml Vollblut mit 25 000 i.E. Heparin (Heparin Na, Medac, Hamburg/BRD). Es wurden 28 Proben von 18 Spendern untersucht, Altersdurchschnitt: 30 Jahre (19 J - 44 J), davon 8 weibl. und 10 männl. 25 Versuchsreihen wurden durchgeführt und ausgewertet (3 x unzureichende Isolierung). Entnahmezeit: 10^{00} Uhr, 14^{00} Uhr, 16^{00} Uhr.

zu I:

- Medium: Dulbeccos MEM für die Chemilumineszenz, mit Hepes, ohne Glutamin, ohne Phenolrot, steril, 607 789 Boehringer, Mannheim/BRD
- Humanserumalbumin, lyophilisiert, ORHA 20/21, Behringwerke, Marburg/BRD

- H_2O bidest.: Ampuwa^R, Lösung zur i.v. Infusion, Braun, Melsungen/BRD
- Histamin: Histamine free base crystall., H 7152, Sigma, St. Louis/USA
- Cimetidine: Cimetidine crystall., C 4522, Sigma, St. Louis/USA
- Diphenhydramin: Diphenhydramine HCl crystall., D 3630, Sigma, St. Louis/USA
- Sterilfilter FP 030/3 - Ø 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Hamburg/BRD

zu II:

- Polystyrolröhrchen 3 ml Inhalt, Greiner, Stuttgart/BRD

zu IV:

- Parafilm^R: American Can Compan., Greenwich/USA
- Inkubation: Inkubator, Melag, Berlin/BRD
- 8000g - Zentrifuge: Nr. 5412, Eppendorf, Hamburg/BRD

zu V:

- Isoton II: Coulter Electronics, Krefeld/BRD
- Cello-Lyse-3: Dilab, Karlsruhe/BRD
- Cellcounter: ai 134, Dilab, Karlsruhe/BRD

zu VI:

- Ultraschall: Bransonic B 12 mit konischer Mikrospitze, Bransonic Sonic Power Comp., Danburg/USA
- Trichloressigsäure (TCA), fest, PhEu 73, Merck, Darmstadt/BRD
- Lyophilisierung: Beta I, Christ, Leonberg/BRD

zu VII:

- 85% $O^{-}PO_4$, Nr. 573, Merck, Darmstadt/BRD
- α, α' - Dipyridil crystall. D 7505, Sigma, St.Louis/USA in H_2O bidest. aufkochen und abkühlen lassen
- $FeCl_3$, analytisch, fest, Merck, Darmstadt/BRD
- Alkohol: Ethanol, absolut, reinst, Nr. 986, Merck, Darmstadt/BRD
- Photometer PM 4, C. Zeiss KG, Oberkochen/BRD, Empfindlichkeitsstufe 5 nm
- L+Ascorbinsäure fein, gepulvert, Nr. 50078, Merck, Darmstadt/BRD

I. Herstellen der Stammlösungen

- Medium: Dulbeccos MEM f. d. Chemil. + 0,1% Humanserumalbumin
- Histamin: 10 mg Histamin auf 100 ml H_2O bidest. lösen = H I; 0,1 ml H I auf 9.9 ml Medium lösen = H II
- Cimetidine: 25,2 mg Cim. auf 10 ml H_2O bidest. lösen = C I; 1 ml C I auf 9.0 ml Medium lösen = C II (10^{-3}mol)
- Diphenhydramin: 29,1 mg Diphenhydramin auf 10 ml H_2O bidest. lösen = D I (= 10^{-2}mol)

Das Medium wurde für jede Versuchsreihe frisch angesetzt und vor Gebrauch steril filtriert. Die Stammlösungen C II, D I und H II wurden vor Beginn der Versuche hergestellt, je 1,5 ml in Eppendorf-Cups abgefüllt, bei - 20°C aufbewahrt und zum jeweiligen Versuch bei Raumtemperatur aufgetaut.

II. Versuchsvorbereitung

Das nach 2.2.1 aus der 1. Waschung mit NaCl-Lösung erhaltene Zellpellet wurde mit 8 ml NaCl-Lösung resuspendiert, und nach Bestimmung der Zellzahl (s. V) eine Menge von

1 - 3 (V 21 - 33) bzw. 2 - 6 (V 01 - 20) Zellen eingestellt. Die Suspension wurde auf 6 Polystyrolröhrchen (V 01 - 20) bzw. auf 8 Eppendorf-Cups (V 21 - 33) verteilt. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit 250 g für 5 Min. Das resultierende Zellpellet wurde sofort weiterverarbeitet (s. III).

III. Pipettieren der Versuchslösungen

Zum Zellpellet wurde hinzugefügt:

Pipettierschema (V 01 - 05, 11 - 20)
(Menge in ml)

Nr.	Medium	H II	C II	D I	
1	2	---	---	---	Kontr.: Vitalität, Reinheit
2	2	---	---	---	Leerwert
3	1,8	0,2	---	---	Histamin 100 ng/ml
4	1,0	1,0	---	---	Histamin 500 ng/ml
5	1,8	---	0,2	---	Cimetidine 10^{-4} mol
7	0,8	1,0	0,2	---	Histamin 500 ng/ml + Cimetidine 10^{-4} mol

Pipettierschema (V 21 - 33, Menge in ml)

Nr.	Medium	H II	C II	D I	
1	1	---	---	---	Leerwert o. Inkub.
2	1	---	---	---	Leerwert
3	0,9	0,1	---	---	Histamin 100 ng/ml
4	0,5	0,5	---	---	Histamin 500 ng/ml
5	0,9	---	0,1	---	Cimetidine 10^{-4} mol
6	0,9	---	---	0,01	Diphenhydramin 10^{-4} mol
7	0,4	0,5	0,1	---	Hist. 500 ng/ml + Cimetidine 10^{-4} mol
8	0,49	0,5	---	0,01	Hist. 500 ng/ml + Cimetidine 10^{-4} mol

IV. Inkubation

Sofort nach Herstellung der Inkubationslösungen wurden die Versuchsgefäße verschlossen (V 01 - 20: Parafilm^{R}, V 21 - 33: Deckel des Eppendorf-Cups) und durch kräftiges Schütteln vermischt; anschließend bei 37° C 1 Std. inkubiert. Die Probe Nr. 1 wurde bis V 20 mitinkubiert, ab V 21 direkt weiterverarbeitet (s. VI, VII).

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde eine Probe (0,02 ml) entnommen, um darin die Zellzahl zu bestimmen (siehe V). Danach wurden die Zellen von V 01 - 20 bei 250 g 5 Min. abzentrifugiert, von V 21 - 33 bei 8000 g 1/2 Min. Beide Zentrifugationsmethoden ergaben hinsichtlich Ausbeute und Vitalität der Zellen vergleichbare Ergebnisse.

V. Bestimmung der Zellzahl

Eine Probe von 0,02 ml wurde in 8 ml Isoton II + 2 Tropfen Cello-Lyse-3 gelöst und im Cellcounter gezählt.

VI. Zellyse

Der aus IV erhaltene Zellpellet wurde folgendermaßen behandelt:

V 01 - 20: Ultraschall-Lyse in 0,4 bzw. 0,8 ml (Doppelbestimmung) 5% TCA-Lösung, 6 x 15'' bei 60 Watt in Eiskühlung

V 21 - 25: Aufnehmen des Zellpellet in 0,5 ml H_2O bidest, Kühlung mit flüssigem Stickstoff (- 190° C), 12 Stunden Lyophilisierung.

V 26 - 33: Aufnehmen d. Zellpellet mit 0,15 ml 5% TCA, 10 Min. stehen lassen, gefrieren mit flüssigem Stickstoff, auftauen (14° C Leitungswasser), dann sofort tiefgefrieren bei - 20° C.

VII. Ascorbatbestimmung

Die Proben wurden aufgetaut und sofort weiter verarbeitet. In Vorversuchen zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung zwischen der bewährten Methode von DENSON/BOWERS (64) und der Methode nach ZANNONI (205), so daß eine modifizierte Zannoni-Methode angewandt wurde; dabei wurden die Bestimmungen wie folgt verteilt:

- bei Zellzahlen unter 2,5 x 10^6: Einfachbest. (V 01-05)
- bei Zellzahlen von 2,5 - 3,5 x 10^6: Doppelbestimmung
- bei Zellzahlen über 3,5 x 10^6: Dreifachbest. (V 26-33)

Halb-Mikro-Modifikation (V 01 - 20):

- 5 Min. Zentrifugation bei 8000 g
- aus dem Überstand 0,3 ml Probe; dazu 0,15 ml 5% TCA-Lösung, 0,03 ml 85% H_3PO_4, 0,24 ml 1%ige wässrige α, α' Dipyridil-Lösung, 0,03 ml 3% $FeCl_3$
- 10 Min. bei Raumtemperatur stehenlassen
- 5 Min. bei 8000 g zentrifugieren
- in einer Einmal-Halb-Mikroküvette bei 525 nm schnell messen (bei jeder Messung wurde eine neue Eichkurve angefertigt mit 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 µg Ascorbinsäure/ml.

Halb-Mikro-Modifikation (V 21 - 25):

Der lyophilisierte Zellpellet wurde mit 0,45 ml 5% TCA-Lösung resuspendiert.

Alkoholische Mikro-Methode (V 26 - 33):

Um die Empfindlichkeit der Methode zu erhöhen, und um die Schwierigkeiten, die mit der wässrigen Dipyridil-Lösung (Auskristallisierung) auftraten, zu umgehen, wurde eine Abwandlung der ZANNONI-Methode eingeführt: die alkoholische Lösung von Dipyridil.

- zum Zellpellet 0,2 ml 5% TCA-Lösung hinzufügen
- 10 Min. bei 8000 g zentrifugieren
- 0,15 ml des Überstandes vorsichtig abheben, dazu jeweils 0,015 ml 85% $O^{-}PO_4$, 8%ige alkoholische Dipyridil-Lösung, 3%ige $FeCl_3$-Lösung hinzufügen
- 10 Min. bei Raumtemperatur stehenlassen
- 5 Min. bei 8000 g zentrifugieren
- 0,15 ml abheben, bei 525 nm in Mikroküvetten mit schwarzen Seitenflächen messen (zur Eichung wurde ebenfalls ein Ascorbatstandard mitgeführt)

VIII. Plasma-Ascorbat

Die Plasmaproben wurden nach dem Auftauen deproteinisiert (1 ml Plasma + 0,12 ml 40%ige TCA) und parallel zu den jeweiligen Zellproben bestimmt.

IX. Methoden - Fehler

Die Ascorbat-Eichkurve war zwischen 16 µg und 1 µg/ml linear; im Bereich von unter 0,5 µg/ml wurde der Ablesefehler für die Extinktionsmessung so groß, daß keine Linearität mehr bestand.
Bei Doppel- und Dreifachbestimmungen differierten die Ergebnisse um durchschnittlich 0,3 µg/ml, das entspricht einem Fehler von 5 - 8% bei den endgültigen Resultaten.
Bei allen Versuchen lag die Ascorbatkonzentration in den Bestimmungsansätzen zwischen 1 µg und 8 µg/ml, d.h. im Linearitätsbereich der Eichkurve.

X. Statistische Auswertung

Das statistische Modell für den angewandten Versuchsansatz ist die Varianzanalyse für verbundene Stichproben.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Granulozytenisolierung

Die Granulozytenisolierung für die Chemilumineszenz wurde bereits in unserem Labor methodisch untersucht (43).
Während der Experimente zu 2.2.4 und 3.3.1 ergaben die Untersuchungen zur Methodik:

Ausbeute

- bei EDTA-Blut-Isolierung: 24% Granulozyten, bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl im Vollblut (n = 8, Streuung: 16% - 35%)
- bei Heparin-Blut-Isolierung: 8,3 % Granulozyten, bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl im Vollblut (n = 8, Streuung: 4,8 % - 12,2 %)
- nach den zusätzlichen Zentrifugationen zu 2.2.4, IV: die gemessenen Zahlen änderten sich um maximal 10 %, das entspricht der Fehlerquote der Zählung im Cell-Counter.

Reinheit

- bei Ausdifferenzierung der isolierten Zellpellets: 98 % Granulzyten (n = 6, Streuung: 96 % - 99 %, 2 % Lymphozyten)
- Verunreinigung durch Thrombozyten (mögliche Fehlerquelle bei der Ascorbatbestimmung (70)): 0,45 % Thrombozyten im Zellpellet bezogen auf die Gesamtthrombozytenzahl im Vollblut (n = 4, Streuung: 0,3 % - 0,5 %); das entspricht einer Verunreinigung von ca 1 Thrombozyten/Granulozyten im Zellpellet.

Vitalität

Bei 4 Proben betrug der Anteil vitaler Zellen im resultierenden Zellpellet (2.2.1 - III) 94 % - 96 %; die zusätzlichen Inkubationen und Zentrifugationen zu 2.2.4 (Ascorbatbestimmung) brachten keine weiteren Vitalitätseinbußen (4 Kontrollen)

2.3.2 Chemotaxis

Versuchsreihe A

Tabelle 1 sowie Schaubild 4 zeigen die CT-Faktoren nach Vorinkubation von PMN's mit Histamin und anschließender Stimulation mit 10^{-6}mol N-f-Met-Leu-Phe.

Versuchsreihe B

Tabelle 2 sowie Schaubild 3 zeigen die CT-Faktoren nach Vorinkubation der PMN's mit Cimetidine bzw. mit Cimetidine + 500 ng/ml Histamin.

Versuchsreihe C

Tabelle 3 sowie Schaubild 4 zeigen die CT-Faktoren nach Vorinkubation der PMN's mit Ascorbinsäure + Histamin.

Tabelle 1

Versuchsreihe A

CT-Faktoren nach Vorinkubation mit Histamin und anschließender Stimulation mit 10^{-6}mol N-f-Met-Leu-Phe

Histamin (ng/ml)	Anzahl der Versuche	Mittelwert $\bar{x}$	s
0	22	10.7	(4.9)
100	15	9.3	(4.4)
300	4	7.5	(0.9)
500	18	6.9	(3.7)
1000	7	6.0	(2.7)

Tabelle 2

Versuchsreihe B

CT-Faktoren nach Vorinkubation mit Cimetidine bzw. mit Cimetidine+500 ng/ml Histamin und anschließender Stimulation mit 10^{-6}mol N-f-Met-Leu-Phe

Histamin (ng/ml)	Cimetidine (mol)	Anzahl der Versuche	Mittelwert $\bar{x}$	(s)	CT-Abnahme % *
0	0	13	10.9	(3.5)	--
500	0	13	6.5	(2.5)	40.4
0	10^{-3}	6	9.4	(3.6)	13.8
500	10^{-3}	6	8.7	(3.4)	20.2
0	10^{-4}	9	8.4	(3.0)	22.9
500	10^{-4}	9	9.0	(3.0)	17.4
0	10^{-5}	4	8.0	(1.6)	26.6
500	10^{-5}	4	8.8	(1.0)	19.3

* = bezogen auf den Kontrollwert(Vorinkubation nur in Medium)

Tabelle 3

Versuchsreihe C

CT-Faktoren nach Vorinkubation mit Ascorbat+Histamin und anschließender Stimulation mit 10^{-6}mol N-f-Met-Leu-Phe

Histamin (ng/ml)	Ascorbat (mg%)	Anzahl (n)	Mittelwert $\bar{x}$	s
100	1.6	7	9.2	(2.2)
300	4.8	4	9.2	(1.1)
500	8.0	16	9.2	(5.6)
1000	16.0	5	6.8	(1.9)

Vergleich der Versuchsreihen A + C

Tabelle 4 sowie Schaubild 4 zeigen, wie Ascorbinsäure den Einfluß von Histamin auf die Chemotaxis von PMN's verändert(Vorinkubation mit Histamin bzw. mit Histamin+ Ascorbat, anschließende Stimulation mit NMLP).

Tabelle 4

Versuchsreihen A/C im Vergleich

CT-Faktoren nach Vorinkubation mit Histamin bzw. Histamin+Ascorbat und nachfolgender Stimulation mit 10^{-6}mol N-f-Met-Leu-Phe

Histamin (ng/ml)	Ascorbat (mg%)	Mittelwert $\bar{x}$	CT-Abnahme % *
100	0	9.3	13+
100	1.6	9.2	14+
300	0	7.5	30
300	4.8	9.2	14+
500	0	6.9	36
500	8.0	9.2	14+
1000	0	6.0	44
1000	16.0	6.8	37

* = bezogen auf den Kontrollwert(Vorinkubation nur in Medium)

+ = die Werte unterscheiden sich nicht signifikant vom jeweiligen Kontrollwert(T-Test f. verb. Variab.)

Schaubild 3

CT-FAKTOR nach 30 min Inkubation mit Histamin Histamin/Cimetidine

nachfolgend Stimulation mit 10^{-6} mol N-f-Met-Leu-Phe

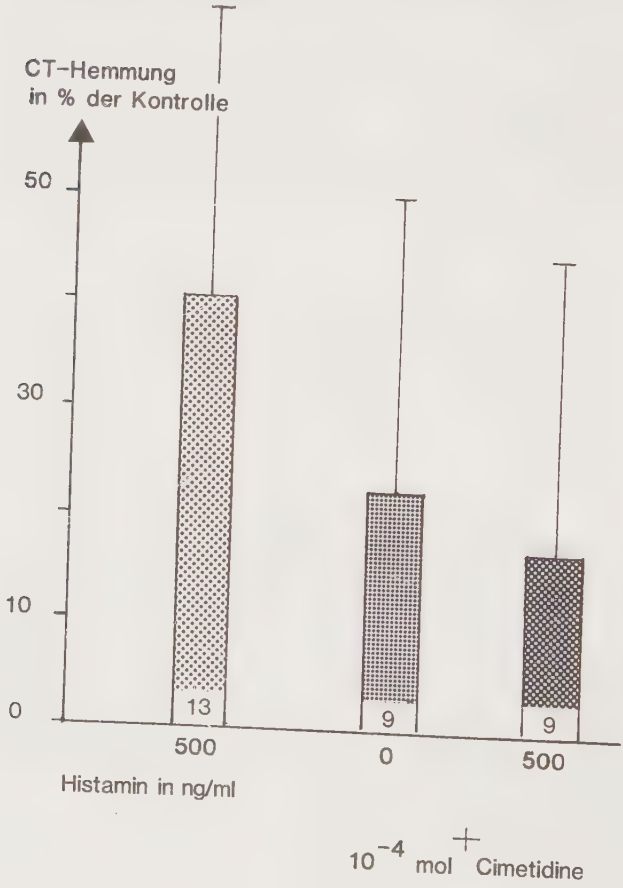
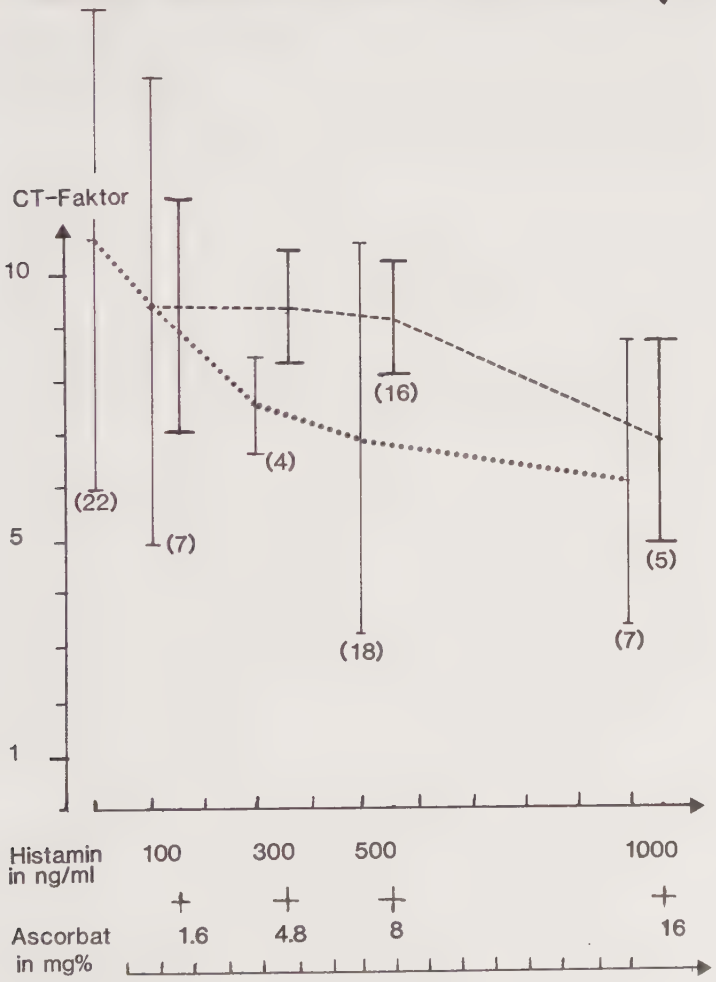


Schaubild 4

CT-Faktor nach 30 min Inkubation mit Histamin (····) und Histamin/Ascorbat

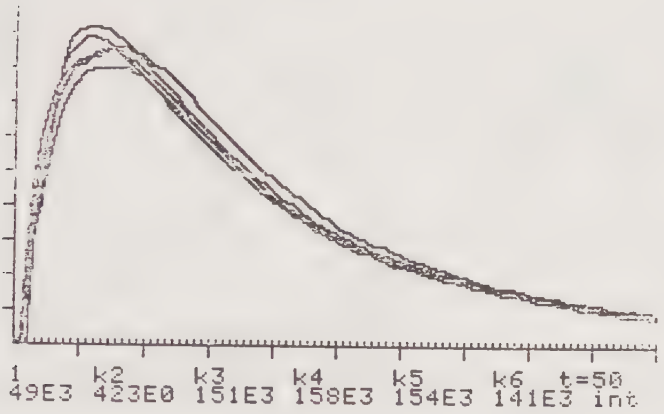
anschließend Stimulation mit 10^{-6} mol N-f-Met-Leu-Phe (----)



2.3.2 Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenz der isolierten polymorphonukleären Leukozyten (PMN's) wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen (V_1 - V_3: 10 Min. Vorinkubation, V_4 - V_6: 30 Min. Vorinkubation) durch Histamin in den Konzentrationen 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml nicht geändert. Die Ergebnisse sind nicht tabellarisch aufgeführt. Die nachstehenden Schaubilder 5 und 6 zeigen typische Kurven.

Schaubild 5
Chemilumineszenz menschlicher Granulozyten unter Einfluß von Histamin; Stimulation nach 10 Min. Vorinkubation durch opsonisiertes Zymosan



Kammer 1: Leerwert
Kammer 2: Histamin 500 ng/ml ohne Zymosanzugabe
Kammer 3: Histamin 5o ng/ml
Kammer 4: Histamin 100 ng/ml
Kammer 5: Histamin 500 ng/ml
Kammer 6: Histamin 1000 ng/ml

Schaubild 6
Chemilumineszenz menschlicher Granulozyten unter Einfluß verschiedener Histamin-Konzentrationen; Stimulation nach 10 bzw. 30 Min. durch opsonisiertes Zymosan

Kammer 1: Leerwert, nach 10 Min. Zymosan
Kammer 2: Leerwert, nach 30 Min. Zymosan
Kammer 3: Histamin 500 ng/ml, nach 30 Min. Zymosan
Kammer 4: Histamin 100 ng/ml, nach 10 Min. Zymosan
Kammer 5: Histamin 500 ng/ml, nach 10 Min. Zymosan
Kammer 6: Histamin 1000 ng/ml, nach 10 Min. Zymosan

2.3.4 Intrazelluläres Ascorbat

Tabelle 5 zeigt die einzelnen Versuchsergebnisse, die nach Vorinkubation von PMN's mit Histamin, Cimetidine, Histamin + Cimetidine, Diphenhydramin und Diphenhydramin + Histamin ermittelt wurden. Es wurden 25 Versuchsreihen durchgeführt; davon waren die Ergebnisse von 4 Versuchsreihen unvollständig (mehr als 2 Einzelergebnisse fehlen) und 3 weitere Versuchsreihen nicht berücksichtigt, weil die Ergebnisse um mehr als 50 % über dem Kontrollwert (Leerwert ohne Zusätze) lagen (Pipettierfehler ? Meßfehler?).

Da die Ergebnisse bei den verschiedenen Zellyse-Methoden (2.2.4-IV) vergleichbar sind, wurden sie gemeinsam ausgewertet. Eine Zusammenfassung zeigt Tabelle 6, Schaubild 7 gibt eine graphische Übersicht.

Der Plasmaascorbatgehalt bei den Spendern betrug 6.3 µg/ml (n = 10, s = 3.3, Streuung: 2.4 - 12.3); dies entspricht 35 µmol.

Tabelle 5

Intrazelluläres Ascorbat nach 60 Minuten Inkubation mit Histamin, Histamin + Cimetidine, Cimetidine, Diphenhydramin und Diphenhydramin + Histamin

- Einzelergebnisse (in µg Ascorbat/10^8 Zellen) -

V-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
02	--	24	24	13	24	--	18	--
03	--	28	22	20	18	--	17	--
05	--	31	25	23	29	--	31	--
14	--	18	20	12	10	--	14	--
15	--	15	14	12	14	--	15	--
17	--	29	36	36	--	--	32	--
18	--	30	34	35	--	--	24	--
20	--	10	11	11	10	--	12	--
22	15	20	19	17	19	21	19	21
23	24	40	30	30	31	35	35	40
26	--	22	21	24	23	22	29	26
27	--	26	24	23	--	25	25	30
28	31	20	22	25	22	24	24	--
29	23	22	22	16	20	26	25	21
30	23	21	20	23	24	19	26	27
31	30	27	25	21	--	27	32	33
33	--	32	26	27	--	30	34	20

1 = Leerwert o. Inkub.
2 = Leerwert m. Inkub.
3 = Histamin 100 ng/ml
4 = Histamin 500 ng/ml
5 = Cimetidine 10^{-4}mol
6 = Diphenhydramin 10^{-4}mol
7 = Hist.500 ng/ml+Cim.10^{-4}mol
8 = Hist.500 ng/ml+Di.10^{-5}mol

Werte V 01-05: Einfachbestimmung; V 11-25: Doppelbestimmung; V 26-33: Dreifachbestimmung.

Tabelle 6

Intrazelluläres Ascorbat nach 60 Minuten Inkubation mit Histamin, Cimetidine, Diphenhydramin, Histamin + Cimetidine und Diphenhydramin + Histamin

- Zusammenfassung der Ergebnisse -

	Anzahl (n)	Mittelwert in $\mu g/10^8$ Zellen ($\bar{x}$)	s	Mittelwert in $\mu M/10^9$ Zellen ($\bar{x}$)
1	6	26.6	(6.5)	1.5
2	17	23.2	(8.3)	1.4
3	17	23.4	(6.1)	1.3
4	17	22.0	(7.7)	1.2
5	12	21.2	(7.1)	1.2
6	9	24.7	(7.4)	1.4
7	17	23.2	(8.4)	1.3
8	8	26.5	(7.7)	1.5

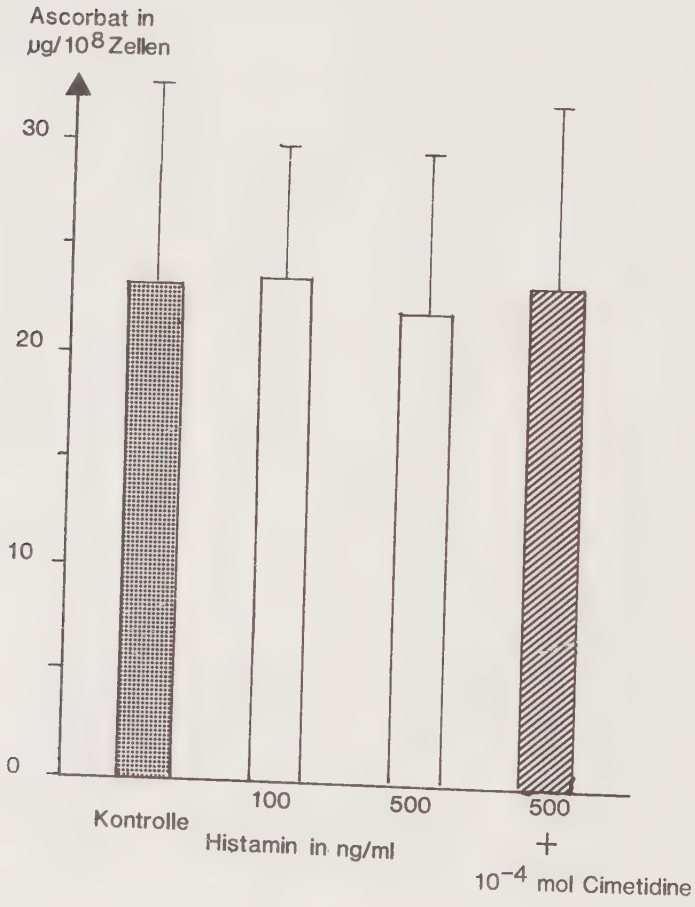
1 = Leerwert ohne Inkubation
2 = Leerwert mit Inkubation
3 = Histamin 100 ng/ml
4 = Histamin 500 ng/ml
5 = Cimetidine 10^{-4} mol
6 = Diphenhydramin 10^{-4} mol
7 = Histamin 500 ng/ml + Cimetidine 10^{-4} mol
8 = Histamin 500 ng/ml + Diphenhydramin 10^{-4} mol

2 + 4 = schwach signifikant ($p = 0.05$) verschieden (T-Test für abhängige Variabeln)
2 + 5 = gering signifikant verschieden ($p = 0.10$)

Schaubild 7

INTRAZELLULÄRES ASCORBAT

neutrophiler Granulozyten nach 1 h Inkubation



(n) : 17 pro Versuchsreihe

2.4 Diskussion

Die neutrophilen Granulozyten (PMN's) sind entscheidend für die sofortige direkte Abwehr von eingedrungenen Mikroorganismen sowie für den Abbau abgestorbener Zellen in der ersten Entzündungsphase (siehe 1.3). Es sollte in den hier beschriebenen Experimenten untersucht werden, ob Histamin die Granulozytenfunktion in Teilbereichen (Chemotaxis, Chemilumineszenz) beeinflußt, ob festgestellte Veränderungen nach Histaminzusatz über H_2 - Rezeptoren vermittelt werden, und ob Ascorbat die Histaminwirkungen aufhebt. In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, wie sich die extrazelluläre Histaminkonzentration auf den intrazellulären Ascorbatspiegel auswirkt.

Die verwendete Technik der Granulozytenisolierung (Percoll-Methode) ist eine sehr selektive (98% Reinheit) und schonende Methode. Das belegen die günstigen Ergebnisse im Trypanblautest (95% vitale Zellen) und die hohe Aktivität der Granulozyten in den Chemotaxis- und Chemilumineszenz-Tests: Mit dem Tripeptid N-f-Met-Leu-Phe 10^{-6}mol wanderten 10 mal mehr Zellen durch die Testmembran als bei der Kontrolle ohne Stimulation. Im Vergleich mit der bisher bevorzugten Dextran-Isolierungsmethode (64, 111) dauert die Percoll-Methode zwar etwas länger und ist technisch aufwendiger, liefert dafür aber eine reinere Granulozytenfraktion mit hoher chemotaktischer Aktivität. Die hohe Zellspezifität führt zu genaueren Aussagen über die Chemilumineszenz von polymorphonukleären Leukozyten (PMN's).

Die Chemotaxis-Versuche ergaben eindeutig eine dosisabhängige Inhibition durch Histamin, was auch mit den Ergebnissen anderer Untersucher übereinstimmt (12, 98, 133, 167). Die von uns verwendete Konzentration von 1000 ng/ml entspricht ungefähr der in (12) angegebenen von 10^{-5}mol.

Die CT-Hemmung bei Inkubation mit 500 ng/ml Histamin betrug 40%. Die gleichzeitige Vorbehandlung der PMN's mit Histamin (500 ng/ml) und Cimetidine (10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}mol) ergab Werte wie bei der alleinigen Inkubation mit Cimetidine (Versuchsreihe B), was bedeutet, daß Cimetidine die histaminbedingte Inhibition aufhebt. Wegen der biologisch bedingten Streuung können allerdings keine statistisch eindeutig verifizierbaren Aussagen gemacht werden.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe B weisen darauf hin, daß der beobachtete Effekt möglicherweise über H_2 - Rezeptoren vermittelt wird. Somit wäre die Empfehlung, H_2-Blocker bei Chemotaxis-Defekten des allergischen Formenkreises therapeutisch zu verwenden (59), experimentell begründet. Jedoch liegen die experimentell verwendeten Konzentrationen über denen, die bei der Therapie mit Cimetidine erzielt werden (115). Cimetidine selbst hat eine Verminderung des CT-Faktors zu Folge, was sich durch einen teilweisen Rezeptor-Agonismus erklären ließe (Vgl. Ergebnisse der Ascorbatbestimmung). Daher sollten erst noch weitere Untersuchungen gemacht werden, bevor man H_2- Blocker zur Beeinflussung der Chemotaxis von PMN's einsetzt. Interessant in diesem Zusammenhang sind die parallel zu unseren Versuchen durchgeführten Untersuchungen bei Patienten mit akutem Heuschnupfen (128): im Vergleich zu Normalpersonen war bei ihnen die Chemotaxis um 32% erniedrigt. Dies könnte durch den erhöhten endogenen Histaminspiegel erklärt

werden (22, 151).

Die Hypothese, daß Ascorbat eine detoxifizierende Wirkung auf Histamin hat (2, 22, 51, 52, 67, 123, 131, 151, 161), sollte bei den vorliegenden Versuchen durch gleichzeitige Vorinkubation mit Ascorbat und Histamin untersucht werden. Es wird über positive Änderungen der Chemotaxis durch Ascorbatzusatz in Konzentrationen, die um einen Faktor 1oo über dem Plasmaspiegel liegen, berichtet (Normalwert 50 µmol (51, 67, 70, 159) bzw. 90 µmol (129); eigenes Ergebnis: 35 µmol; bei Ascorbatsupplementation: Werte über 100 µmol (60, 171); Konzentrationen bei Chemotaxis-Versuche: 2,5 mmol (88), 10^{-1} bis 10^{-4}mol (10), $5 \cdot 10^{-3}$mol (62), 50 mmol (65)).

In unseren Versuchen verwendeten wir Ascorbatkonzentrationen, die im Größenbereich der Normalwerte liegen. Deshalb dürfte bei diesen Experimenten Ascorbat allein keine Veränderung der Chemotaxis hervorgerufen haben.

Bei den Histaminkonzentrationen 300 ng/ml bzw. 500 ng/ml zeigt Ascorbat (4.8 mg% bzw. 8 mg%) eine deutliche Wirkung: Es gleicht die Histamin-bedingte Chemotaxis-Inhibition aus, d.h. die erzielten Werte unterscheiden sich nicht signifikant von den Normalwerten. Die Inhibition von 1000 ng/ml Histamin konnte durch 16 mg% Ascorbat nicht verhindert werden. Unsere Untersuchungen können die oben erwähnte Hypothese nicht widerlegen oder eindeutig unterstützen, sie sind aber weitere in-vitro-Hinweise dafür, daß die These von der Histamin-Detoxifikation durch Ascorbat möglicherweise richtig ist.

Eine denkbare Verwendung höherer Ascorbat- oder Histaminkonzentrationen wäre nicht sinnvoll, da es dabei zu unphysiologischen Verhältnissen käme (52).

Einige Fehlermöglichkeiten bei der klassischen Boyden-Technik zur Chemotaxisbestimmung (168) versuchten wir durch die von BRUCHELT (42) erarbeiteten Modifikationen zu umgehen,

1) um die Ablösung von durchgewanderten Zellen zu vermeiden:
   - verkürzte Inkubationszeit
   - kleinere Zellkonzentrationen
   - Entfernen der Chemotaxisflüssigkeit vor Entnahme der Membranen (Wegfall von Adhäsionskräften)
   - sehr vorsichtiges Abheben der Membranen
2) um die innerhalb der Membran verbleibende Zellfraktion zu verringern:
   - Verwendung von extrem dünnen Membranen
3) um ungleiche Verteilung der Zellen auf der Membran beim Aufbringen der Zellsuspension und ungleiche Wanderungsmuster nach Inkubation zu vermeiden:
   - keine Berücksichtigung der Zellen, die sich in der Randzone der Membran befinden (dort waren - unabhängig von den jeweiligen Versuchsbedingungen - hohe Zellzahlen vorhanden).

Bei den gewählten Versuchsbedingungen konnte zwischen Chemokinese und Chemotaxis nicht unterschieden werden. Deshalb bleibt die Beobachtung, daß Histamin die Chemokinese steigert, während es die Chemotaxis inhibiert (12), ein Hinweis, der erst in weiteren Experimenten untersucht werden könnte.

Die Vorinkubation mit Histamin zeigte keinen Einfluß auf die Chemilumineszenz menschlicher polymorphonukleärer Leukozyten (PMN's). Die gewählten Histaminkonzentrationen entsprechen physiologischen (10^{-6}mol, 30-120 ng/ml) und pathologischen (bis 10^{-5}mol, 1000 ng/ml (97)) Werten.

Die Versuche waren unter dem Gesichtspunkt einer hohen Photonenemission (ausgedrückt in "counts") konzipiert, d.h. daß die Granulozyten möglichst optimal mit opsonisiertem Zymosan stimuliert wurden. Möglicherweise sind die Histamin-bedingten Effekte so schwach, daß sie erst bei suboptimaler Stimulation im Chemilumineszenz-Test erkennbar sind (42). Die große Sensivität der verwendeten Chemilumineszenz-Methode ließe zwar Messungen auch unter solchen Bedingungen zu, jedoch wird die Beurteilung äußerst schwierig, da ein Grundrauschen, d.h. rein zufällige Ereignisse, unvermeidlich sind.

Der durchschnittliche Ascorbatgehalt bei den verwendeten Granulozyten betrug 26,6 bzw. 24,2 µg Ascorbat/10^8 Zellen (nach 1 h Inkubation im Medium). Dieses Versuchsergebnis ist mit den in der Literatur angegebenen Werten vergleichbar (Gesamtleukozytenpopulation: 13.8 (188), 22.8 (67), 13.2 (64), 38.0 (129), 40.0 (171) µg/10^8 Zellen; isolierte Granulozyten: 11.3 (63), 14.8 (24) µg/10^8 Z., 0.53 µmol/10^9Z. (70), das entspricht 10 µg/10^8Zellen, 66 nmol/10^8 Zellen (204 ≙ 12.5 µg/10^8 Zellen, 75 nmol/10^8 Zellen (176) ≙ 14.2 µg/10^8 Zellen).

Die starke Variation innerhalb der angegebenen Zahlenwerte erklärt sich daraus, daß sowohl die Isolationsmethoden für Granulozyten (Dextran (64), Metrizoat (111), Ficoll-diazoat (70)) als auch die Methoden zur Bestimmung des intrazellulären Ascorbats (DENSON/BOWERS (64, 111, 70), ROE (2)) unterschiedlich sind. Außerdem werden die verschiedensten Techniken zur Zellyse beschrieben, wie Homogenisation mit einem Glasstab (111) oder Zufügen von TCA mit anschließender starker Zentrifugation (70). Die angewandte Percoll-Methode (157) zur Zellisolation ist äußerst zellschonend und effektiv, die ZANNONI-Methode zur Ascorbatbestimmung (205) zeichnet sich durch ihre

hohe Empfindlichkeit aus.

Um Störungen der empfindlichen ZANNONI-Methode durch evtl. EDTA-Verunreinigungen zu vermeiden, wurde Heparinblut verwendet. Die um 65% geringere Granulozytenausbeute ließ sich durch Entnahme höherer Blutmengen ausgleichen.

Es liegen bereits Untersuchungen über den Einfluß von extrazellulärem Ascorbat auf die Histamin-Detoxifikation vor (vgl. 2.1.2.3, Seite 25 - 27). Im dritten Teil der Experimente über den Einfluß von Ascorbinsäure auf die Funktion neutrophiler Granulozyten sollte ergänzend dazu geklärt werden, ob Beziehungen zwischen extrazellulärem Histamin und intrazellulärem Ascorbat bestehen.

Das intrazelluläre Ascorbat wurde durch die physiologische Histaminkonzentration von 100 ng/ml nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C nicht geändert (Kontroll- und Histaminwert: 23.2 µg Asc/10^8Zellen, n = 17 bzw. 17, s = 8.3 bzw. 6.1). Bei Inkubation mit 500 ng/ml Histamin fiel das intrazelluläre Ascorbat um 5% von 23.2 auf 22.0 µg/10^8Zellen (n = 17, s = 8.3 bzw. 7.7). Der Unterschied der Durchschnittswerte ist nur gering, doch ergibt der T-Test für verbundene Variabeln einen signifikanten Unterschied von p = 0.05. Es ist also bei pathologischen Histamin-Konzentrationen eine leichte Abnahme des intrazellulären Ascorbats festzustellen.

Wie bei den Chemotaxis-Versuchen wurde nun Cimetidine eingesetzt, um zu prüfen, ob der Histamin-Effekt über H_2-Rezeptoren vermittelt wird. Bei Inkubation mit 10^{-4}mol Cimetidine sank das Ascorbat um 9% auf 21.2 µg/10^8Zellen (n = 12, s = 7.1). Hierbei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0.10 errechnet. Der scheinbare Widerspruch zwischen den Ascorbatwerten und den p-Werten für Histamin und Cimetidine erklärt sich aus der unterschied-

lichen Anzahl (n).

Die Mitinkubation von 10^{-4}mol Cimetidine hebt den beobachteten Effekt von 500 ng/ml Histamin auf (Kontrollwert und Histamin/Cimetidine-Wert: 23.2 µg Asc/10^8 Z., n = 17 bzw. 17, s = 8.3 bzw. 8.4).

Trotz der geringen Unterschiede bei den Mittelwerten konnte demnach tendenziell eine Beziehung zwischen pathologischer Histaminkonzentration und intrazellulärem Ascorbat festgestellt werden.
Diphenhydramin als klassischer Histamin-Blocker vom Typ H_1 wurde in den letzten Versuchsreihen zusätzlich eingesetzt. Die Versuchsergebnisse lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Wertezahlen nicht direkt mit den oben genannten vergleichen.

Abschließend möchte ich einige methodische Bemerkungen zur angewandten Technik bei der intrazellulären Ascorbatbestimmung zur Diskussion stellen:

1) Mehr als 50 ml Blut können mit der üblichen Percoll-Methode nicht verarbeitet werden, da sonst der Zeitaufwand eine starke Schädigung der Zellen bewirkte. Versuche, die Gradienten in größeren Versuchsgefäßen herzustellen, scheiterten daran, daß die Granulozytenbande zunehmend unschärfer und die Ausbeute somit geringer wurde.
2) Je Probe konnten etwa 1.0 - 6.0 • 10^6Zellen gewonnen werden. Die sehr empfindlichen Methoden der Zellzählung im Cell-Counter haben einen durchschnittlichen Fehler von 0.1 - 0.2 • 10^6Z., so daß bereits hier erhebliche Störungen auftreten können.
3) Selbst mit der sehr empfindlichen ZANNONI-Methode ist bei einem Ascorbatgehalt von 10^{-7}g je Probe der untere Nachweisbereich erreicht.

Trotz dieser technisch bedingten Fehler und der biologischen Streuung konnten bei einer Blutmenge von maximal 50 ml befriedigende Ergebnisse erzielt werden, während andere Untersucher zur Bestimmung des intrazellulären Ascorbats nach Inkubation mit chemotaktisch wirksamen Substanzen 500 ml Blut benötigten (204).

Mit der hier vorliegenden Versuchsreihe (Histamineinfluß auf intrazelluläres Ascorbat) wären weitere experimentelle Aussagen über die Hypothese gewonnen, daß Ascorbinsäure eine Histamin-detoxifizierende Wirkung hat (2, 22, 51, 52, 67, 123, 131, 151, 161). Dieser viel diskutierte Ascorbateffekt konnte weder widerlegt noch eindeutig bestätigt werden.

Die von einigen Autoren postulierte Wirkung von Ascorbat als O_2^- - Scavenger (31, 108,131,178) kann mit der angewandten Versuchsmethode nicht belegt werden.
Ebenso wie bei den Chemotaxis-Versuchen ist meiner Meinung nach eine denkbare Verwendung höherer Histaminkonzentrationen nicht sinnvoll, weil es dabei zu unphysiologischen Verhältnissen käme (52). Meines Wissens sind Experimente zur Bestimmung des intrazellulären Ascorbats menschlicher PMN's nach in-vitro-Inkubation mit Histamin bisher nicht durchgeführt worden. Deshalb können andere Versuchsergebnisse mit den hier vorliegenden nicht direkt verglichen werden. Interessant ist aber, daß nach Inkubation mit opsonisiertem Zymosan oder PMA (Phorbol-Myristat-Acetat- ein äußerst effektiver Chemilumineszenz-Aktivator) keine Veränderung des Gesamtascorbats in Granulozyten festgestellt, jedoch 30 - 40% des reduzierten Ascorbats zu Dehydro-Ascorbat oxidiert wurde (204).
Im gleichen Experiment verursachte die Inkubation mit NMLP (N-f-Met-Leu-Phe, das bei den vorliegenden Chemotaxis-Versuchen als Chemotaktikum verwendet wurde) einen

Verlust von 25 % des Gesamtascorbats.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ein Einfluß von Ascorbat via Histamin auf die Aktivität von menschlichen PMN's in den durchgeführten Chemotaxis-Versuchen und in den Versuchen über die Beziehung zwischen extrazellulärem Histamin und intrazellulärem Ascorbat teilweise bestätigt wurde, während die Chemilumineszenz nach in-vitro Inkubation mit Histamin keine eindeutigen Ergebnisse erbrachte.

3. E C H I N A C I N

3.1 Einleitung

Auf der Suche nach immunstimulierenden Substanzen wurden in den letzten Jahren Stoffe aus niederen Organismen wie Hefen, Pilzen und Algen (Polysaccharide und Muramylpeptide wie Zymosan, Lentinan, Lichenau) (200), einige Synthetika (Ubichinone, (66), Cepharanthin, Cleistanthin, Diketokoridolin (195) und die Aristolochiasäure (203) erforscht, die experimentell einen Einfluß auf das Immunsystem zeigten. Bis auf die Aristolochiasäure (Tardolyt^{R}) und Ubichinon ist noch keine Substanz klinisch geprüft worden; Aristolochiasäure jedoch ist infolge einer Anordnung des Bundesgesundheitsamtes derzeit als Arzneimittel nicht verfügbar.

Im immunologischen Labor werden Lymphozytenstimulantien pflanzlicher Herkunft benutzt (PHA: Phytohaemagglutinin, aus Phaseolus vulgaris; PWM: Pokeweed mitogen, aus Phytolacca americana; Con A: Concavalin A, aus Concavalia ensiformis (187)), doch haben diese Substanzen in Tierexperimenten auch ausgesprochen immunsuppressive Eigenschaften (175). Hier gilt der Spruch von Paracelsus: "Dosis facit venenum" (ähnlich wie bei der Aristolochiasäure, deren starke Anwendungseinschränkung durch das Bundesgesundheitsamt berechtigterweise angezweifelt werden sollte). Es wäre daher besser, den Begriff "Immunmodulatoren" oder "biological response modifiers" für die Kennzeichnung einer Substanz zu verwenden, die einen Einfluß auf das Immunsystem hat.

Aus der Volksmedizin sind zahlreiche Pflanzen bekannt, die das körpereigene Immunsystem anregen. Eine Gruppe in München beschäftigt sich seit Jahren mit Wirkstoffen aus einigen bekannten Heilpflanzen (Eupatorium, Echinacea, Calendula, Arnika, Chamomilla, Baptisia, Eleutherococcus)

und konnte zeigen, daß komplex zusammengesetzte Heteroglykane pflanzlicher Herkunft immunstimulierende Eigenschaften besitzen (195). Neben Panax Ginseng (77), Viskum album (30) und Eupatorium cannabinum (92) gehört Echinacea purpurea und E. angustifolia zu den Pflanzenextrakten, die am häufigsten untersucht wurden, vor allem in der Form des standardisierten Auszuges Echinacin^{R} (Fa. Madaus, Köln).

3.1.1 Historischer Überblick

Obwohl Echinacea erst seit knapp 100 Jahren (15) in der europäischen Pharmakopoe bekannt ist, hat es sich in den letzten 4 Jahrzehnten als Phytotherapeutikum durchgesetzt. Es ist in zahlreichen Komplexpräparaten enthalten (Exberitox, Pascotox, Echinatruw, E.A.P.61, Lymphozil, Toxiselect, Infludo, Influex, Echinacea complex VoWe, Contramutan (48)).

"In der amerikanischen Volksmedizin ist Echinacea schon lange als Antiseptikum bekannt. Ein homöopathischer Arzt soll eines Tages eine Squaw dabei angetroffen haben, wie sie Echinaceapflanzen zwischen Steinen zerquetschte. Sie erzählte ihm, daß der so gewonnene Pflanzenbrei zum Verbinden von Wunden diente, die sich die Männer auf der Jagd zugezogen hätten, und daß die so behandelten Wunden rasch heilten. Der Arzt verschaffte sich Echinacea und stellte Versuche damit an, die sich erfolgreich erwiesen. Durch ihn kam dann Echinacea in den USA bald allgemein in Gebrauch." (79)

Echinacea, das "homöopathische Penicillin", verdankt seine weite Verbreitung vor allem den homöopathischen Ärzten, die die Pflanzenauszüge als Phytotherapeutikum, d.h. in hohen Konzentrationen, verordneten. Vor 50 Jahren begann man in Deutschland, sich wieder für Echinacea als Heilpflanze zu interessieren. Kriegsbedingt wandte man sich ab 1939 Heilpflanzenpräparaten zu, die zur Unterstützung der Infektionsabwehr, sowie zur lokalen Behandlung geeignet erschienen. In den folgenden Jahren beschäftigte man sich naturwissenschaftlich mit den Inhaltsstoffen der Pflanze und ihren klinischen Anwendungen. Aus den 50iger Jahren liegen zahlreiche klinische Berichte vor (siehe auch 3.1.4), vor allem über die Therapie mit dem standardisierten Pflanzenauszug Echinacin^{R}. Die Standardwerke der Phytotherapie empfehlen die äußerliche und innerliche Anwendung von Echinacea im Sinne einer "Abwehrsteigerung" oder "Umstimmung" (114,118,199; Übersichtsarbeiten: 78,153,209).

3.1.2 Botanik

Echinacea angustifolia und die nahe verwandte Art Echinacea purpurea, die beide arzneilich verwendet werden, wachsen auf Prärien und Sandbänken westlich von Ohio und bevorzugen dabei Kalkablagerungen und trockene Abhänge. Die ausdauernden Stauden gehören zur Gattung der Korbblütler (compositae) und werden botanisch als Brauneria angustifolia (D.C.Heller) bzw. Brauneria purpurea (D.C.Britton) bezeichnet. Im englischen Schrifttum wird die Pflanze "narrow-leaved cone flower", "palepurple cone flower" oder "Black Samson" genannt. (114)

In europäischen Hausgärten ist der "Amerikanische Sonnenhut" oder die "Kegelblume" wegen der Schönheit der Blütenköpfe heimisch geworden, welche in einer Farbpalette von Violettönen, vom Blaßrosa bis zum leuchtenden Purpurrot, blühen. Im Blumenhandel wird die Pflanze als "Brauneria pallida" bezeichnet (78).
Die Pflanze bildet zunächst eine bodennahe Blattrosette, aus der ein Stengel hervorwächst, der einen halben Meter Höhe oder mehr erreichen kann. Die Stengel tragen meist nur einen kegelartigen Blütenkopf, von dessen Basis sich die Strahlenblüten auseinanderspreizen, während die Hüllblätter dachziegelartig angeordnet sind und bei der voll erblühten Pflanze schlaff nach unten hängen. Diese charakteristischen Blüten bewahren ihre Schönheit über mehrere Wochen. Die Blätter der Echinacea angustifolia sind lineal-lanzettlich, am Ansatz verschmälert, dreinervig und ungeteilt oder rauh und gesägt. Bei der Echinacea purpurea sind die unteren Blätter fünfnervig, oval und langgestielt, die oberen oval-lanzettlich (114).

3.1.3 Pharmakologie und Inhaltsstoffe

Therapeutisch wurde von den Indianern die frische Wurzel verwendet, mehrere Autoren empfehlen ebenfalls den Gebrauch der Wurzel. Das HAB (Homöopathisches Arzneimittelbuch) schreibt einen alkoholischen Extrakt aus der ganzen blühenden Pflanze mit Wurzel vor. Echinacin^{R} enthält den wässrigen Preßsaft (2,5 : 1) aus Herba recens Echinacea angustifoliae. Auszüge aus getrockneten Pflanzenteilen sind unwirksam (114).

Der Vollauszug aus Echinacea purpurea Moench enthält ätherische Öle (1,2 - 1,5% in der Wurzel), Glyceride, Tannin, Phenolsäure, gesättigte und ungesättigten Fettsäuren, Inulin, Glukose, Laevulose, Betain (0,1%), verschiedene Glycoside (0,3%) und Enzyme, Ascorbinsäure (in den Blättern), Sulfate, Carbonate, Silikate, Alkali, Magnesium, Eisen und Aluminium (114, 185).

Das Präparat Echinacin^{R} besteht nach Lyophilisierung aus: 25 % wasserlöslichen Peptiden, 40% Zuckerverbindungen, bis 20% Mineralien, dazu noch Spuren von Gerbstoffen, Terpenoiden und Flavoniden (113).

Auf der Suche nach Wirkstoffen wurde zunächst Echinacosid isoliert, ein Glykopeptid, das nicht anti-viral oder bakteriostatisch, wohl aber stimulierend auf die Fibroblasten wirkt (182). In der Wurzel entdeckte man Echinacein, einen insectizid wirkenden Stoff (34, 174), und 1-8-pentadecadiene, das bei Ratten im Experiment antitumorös wirkt (191).

In jüngster Zeit sind zwei Polysaccharide (ein Heteroxylan MG 35 000 und ein Arabinorhamnogalactan, MG 450000) aus Echinaceaauszügen isoliert und teilweise strukturell aufgeklärt worden, die in-vitro starke Makrophagen-, Granulozyten- und T-Lymphozyten-Aktivatoren sind, und - wahrscheinlich über verstärkte Lymphokinin-Freisetzung - zytotoxisch wirken (195,196).

3.1.4 Versuche aus den 40iger und 50iger Jahren

Bei ersten tierexperimentellen Untersuchungen im Jahre 1940 konnte die Räude von Kaninchen und Ratten in kürzester Zeit geheilt werden. Dann folgten einige Versuche, die sich mit den Wirkungsmechanismen von Echinacea-Auszügen beschäftigten:

- Inhibition von Hyaluronidase (45,103): Hyaluronsäure ist ein wesentlicher Bestandteil der Grundsubstanz des Gewebes (Interzellularmatrix). Infolge ihrer hohen Viskosität und engmaschigen Vernetzung setzt sie der Ausbreitung von Bakterien im Gewebe einen mechanischen Widerstand entgegen. Die Inhibition von bakterieller und körpereigener Hyaluronidase erschwert die Ausbreitung von Erregern im Gewebe, was eine indirekte antibakterielle Wirkung erklären ließe.
- Vermehrung der Fibroblasten (103, 106, 185): die dabei entstehenden Fibrozyten sind unter anderem für die Produktion von Hyaluronsäure verantwortlich, womit eine weitere indirekte antibakterielle Wirkung möglich wäre
- beim Kaninchen und bei Ratten konnte eine Aktivierung der Phagozyten und Granulozyten beobachtet werden (55, 102, 106)
- nach anfänglicher Erniedrigung wurde der Properdinspiegel (wesentlicher Bestandteil des alternativen Komplementsystems) beim Kaninchen deutlich und anhaltend erhöht (46)
- "cortikomimetische" Wirkungen (Aktivierung des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems): Progressive Transformation der Nebenniere im Meerschweinchen (102); erhöhte Ausscheidung von 17-OH-Steroiden im Urin beim Menschen (121)

Cortison wirkt in niederen Dosen RES-stimulierend (91), so daß eine cortikomimetische Wirkung von Echinacin ebenfalls immunmodulierend wäre.
- eine antimykotische Wirkung in-vitro (99).

3.1.5 Klinische Anwendungen

Die Indikation, über die die meisten Veröffentlichungen vorliegen, ist die lokale Anwendung von Echinacea bei schlecht heilenden Wunden und Geschwüren (3,75,105), bei Wunden, Verbrennungen, Erfrierungen, Ulcera, Röntgen-Ulcera, Schußverletzungen (85: Anwendung i.v. bzw. peroral), Dekubitus (33).

Die rasche Granulationsbildung bei lokaler Applikation von Echinaceapräparaten wird dabei immer wieder hervorgehoben. Aufgrund dieser Eigenschaft wird Echinacea auch in der Dermatologie verwendet: 2 kleinere Studien (1971, 50 Patienten (165); 1979, 100 Patienten (190)) berichten über hohe Erfolgsquoten (85%) und niedrige Nebenwirkungsraten (2%). Dabei untersuchte Indikationen waren neben den oben bereits erwähnten:
- entzündliche Hauterkrankungen, Ekzeme, Herpes simplex, Ulcus cruris varicosum (Wirksamkeit bei 70% beobachtet)

Aus dem Bereich der Inneren Medizin liegen Berichte vor:
- bei akuten Erkältungskrankheiten und grippalen Infekten ("Stoßtherapie"); bei chronischen Krankheiten mit geschwächter Abwehr (186), bei PCP (rheumatoide Arthritis) und degenerative Gelenkerkrankungen (Arthrosen, Periarthrosen, Osteochondrosen, Tendinosen) "Umstimmungstherapie" mit langsam einschleichender Dosierung (95, 101, 144).

Weitere genannte Indikationen sind:

- Kinderkrankheiten, zur Abwehrsteigerung (21: Diphterie, 208: Pertussis)
- chronisch entzündliche gynäkologische (120, 156) und urologische Erkrankungen (25,71)
- zur Behandlung von strahlenbedingten Leukopenien (34, Komplexpräparat Esberitox^{R})

3.1.6 Versuchsergebnisse aus den letzten 20 Jahren

Beim Menschen tritt nach i.v. Injektion von Echinacin^{R} eine Leukozytose auf (55), die ihren Maximalwert nach durchschnittlich 3 Stunden erreicht (56). Bei längerer ovaler Einnahme wird eine Verminderung der eosinophilen Granulozyten im Blut von 50% beobachtet (121). Bestrahlte Patienten reagieren schwächer auf einen i.v. Provokationstest, was dazu führt, daß der "Echinacin-Test" als Kriterium zur Beurteilung der Knochenmarksreserve vorgeschlagen wurde (56).

Die Leukozytose konnte 1980 auch an Meerschweinchen experimentell gemessen werden (116), im selben Experiment senkte Echinacin die Nekroserate transplantierter Hautlappen hochsignifikant, förderte die Wundgranulation und verbesserte die Strömungsgeschwindigkeit (Rheologie) des Blutes (Nachweis durch Fluorescein-Test).

Eine direkte bakterizide oder bakteriostatische Wirkung von Echinacea purpurea konnte bisher nicht nachgewiesen werden, doch zeigten Versuche im Jahre 1978 mit HeLa-Zellen eine Virushemmung, die mit der Wirkung von Interferon zu vergleichen war (133, 193): Zellen, die mit

Echinacea 4-6 Stunden vorbehandelt waren, zeigten eine erhöhte Resistenz gegen Virusinfektionen. Dieser Effekt hielt etwa 24 Stunden an. Während durch Interferon ein vollkommener Schutz der Zelle gegen alle Viren erreicht wird, gelang dies mit den getesteten Echinacea-Präparationen zu 60% - 80%. Im Unterschied zu Interferon läßt sich die Wirkung von Echinacea durch Zusatz von Hyaluronidase aufheben.

Die Stimulation des RES durch Echinacin im Carbon-Clearance-Test wies eine Dissertation aus dem Jahre 1969 nach. Dabei wurde die Blockierung des RES durch Chloramphenicol bzw. Tetracyclin teilweise aufgehoben (28).
Eine Übersichtsarbeit von 1982 berichtet über einen Versuch, bei dem die Antikörper produzierenden Milzzellen von Mäusen durch Echinacea-Gabe deutlich stimuliert wurden (153). Mäuse, die mit einem Echinacea-haltigen Komplex-Präparat (Echinacea complex - Vo & We), vor bzw. nach einer Bestrahlung behandelt wurden, erkrankten weniger stark an den Bestrahlungsfolgen (82).

Wie schon erwähnt, wurden zwei saure wasserlösliche Heteroglukane aus Echinaceapräparationen isoliert, die stark immunstimulierend wirken sollen (194, 195). Alle durchgeführten immunologischen Tests zeigten ein positives Ergebnis: maximale Stimulierung der Phagozytose im Carbon-Clearance-Test, Steigerung der H^3-Thymidin-Einbaurate im T-Lymphozyten-Transformationstest (20%-30% mehr als bei Stimulation mit Lectin), Vermehrung der antikörperbildenden Zellen im Jerne—Plaque-Test, Verbesserung der Zytotoxizität im Pearlman-Test, Steigerung der Überlebensrate um 50% im Strahlenbelastungs-Test durch Applikation der Polysaccharid-Fraktion vor der Exposition, deutliche Interferonisierung im VSV- Infektionsbelastungs-Test (196). Leider liegen die ausführli-

chen Daten bisher nicht vor, sondern nur jeweils kurze Notizen in Zeitschriftenartikeln (1981,1983).

In einem Phagozytose-Test (Anlagerung und Aufnahme von Hefepartikeln durch menschliche PMN's) zeigte Echinacea die größte Steigerung des Phagozytose-Index, mehr als Aristolochiasäure (Tardolyt^{R}) und Gammaglobulin (Intraglobin F Biotest) (187, aus dem Jahre 1981).

Die erwähnte Phagozytose-Steigerung wurde bei beiden verwendeten Echinacea-Präparaten (Echinacin^{R}, Echinacea-Extrakt, Stadtchemie Hagen) beobachtet, doch sollte hinzugefügt werden, daß die galenische Zubereitung von Echinacin^{R} Mitte der siebziger Jahre geändert wurde; klinischen Beobachtungen zufolge löst die i.v.-Injektion von Echinacin^{R} seitdem das früher sehr häufige Phänomen einer mäßigen Temperaturerhöhung nicht mehr aus. Die stimulierende Wirkung auf die zellulären Komponenten des Immunsystems scheint erhalten, wenn nicht sogar gesteigert, die "corticomimetische" Wirkung (siehe 3.1.4) vermindert (209).

3.1.7 Problemstellung

Es sollte in den vorliegenden Experimenten untersucht werden, ob Echinacin die Funktion menschlicher Granulozyten beeinflußt. Dazu wurden drei verschiedene experimentelle Ansätze gewählt:

- wirkt Echinacin als Chemotaktikum/Chemokinetikum?
- verändert die Vorinkubation mit Echinacin die Chemotaxis/Chemokinesis von PMN's? Das Tripeptid N-f-Met-Leu-Phe als Stimulus soll dabei als Modell eines bakteriellen Entzündungskreises dienen.
- verändert Echinacin die mit der Chemilunineszenz meßbare Antwort von PMN's auf einen definierten Reiz (Zymosan)?

3.2 Methoden

3.2.1 Granulozytenisolierung

Analog der in 2.2.1 beschriebenen Technik wurden die Granulozyten nach dem Percoll-Verfahren isoliert (157). Die Modifikationen für Chemotaxis und Chemilumineszenz sind dort beschrieben, ebenso das weitere methodische Vorgehen.

GERÄTE und MATERIALIEN (siehe 2.2.1)

3.2.2 Chemotaxis

Die nach 2.2.1 isolierten Granulozyten wurden in verschiedenen Versuchsansätzen zur Chemotaxis getestet:

Versuchsreihe E I: Echinacin-Proben, die bei -20°C aufbewahrt worden waren, dienten als Chemotaktikum in der Boyden-Kammer. Als CT-Referenzsubstanz wurde das in allen bisherigen Versuchen verwendete Tripeptid N-f-Met-Leu-Phe (= NMLP) 10^{-6} molar eingesetzt.

Versuchsreihe E II: Gleiches Vorgehen wie in E I; Verwendung von frisch hergestellten Echinacin-Konzentrationen (diese Versuchsreihe wurde zum Teil parallel zur Reihe E III durchgeführt).

Versuchsreihe E III: Die isolierten Granulozyten wurden 15 Min. in verschiedenen, frisch hergestellten Echinacin-Konzentrationen vorinkubiert. Als Kontrolle dienten PMN's, die direkt nach der Isolation stimuliert wurden und solche, die 15 Min. in Medium vorinkubiert wurden. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen (Echinacin-Vorinkubation, Kontrolle: Medium-Vorinkubation) mit NMLP 10^{-6} molar in der Boyden-Kammer.

Bei den Versuchen wurde die Leukozytenzahl im Gesamtblut im Routinelabor der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen mitbestimmt.

GERÄTE und MATERIALIEN

Von 12 gesunden Spendern (6 weiblich, 6 männlich, Durchschnittsalter 29 Jahre, Entnahmezeit 10.00 Uhr) wurden 35 Proben EDTA-Blut zu je 8ml entnommen und verteilt:

- 12 Proben für E I
- 11 Proben für E II
- 12 Proben für E III } z.Teil Parallel-Versuche
- Echinacin-Ampullen zu 2ml wurden freundlicherweise von der Firma Dr.Madaus & Co, Köln/BRD zur Verfügung gestellt.
- sonstige Materialien und Geräte siehe 2.2.2.

I Herstellen der Stammlösungen

Herstellung des Mediums und des Chemotaktikums s. 2.2.2.

E I: Verdünnen der Originallösung 1 : 10 (0,5ml Echinacin auf 4,5ml Medium), aufteilen in Proben zu je 0,5ml, bei -20°C aufbewahren. Zum jeweiligen Versuch Probe auftauen, mit Medium 1 : 10 verdünnen (0,5ml Probe auf 4,5ml Medium) und 4 weitere 1:10-Verdünnungsschritte mit Medium durchführen. Man erhält folgende Konzentrationen: 5mg/ml, 500µg/ml, 50µg/ml, 5 µg/ml, 50ng/ml.

E II: wie bei E I, jedoch hier sofortige Weiterverarbeitung, insgesamt 5 mal 1 : 10 Verdünnung.

E III: Verdünnungsreihe wie bei E II, hier jedoch 6 Verdünnungsstufen 1 : 10 (zusätzliche Konzentration: 5 ng/ml). Da hier kleinere Mengen benötigt wurden, erfolgten die 1 : 10 Verdünnungen mit 0,1 ml Ausgangslösung und 0,9 ml Medium.

II Versuchsvorbereitung (siehe 2.2.2)

E I + E II: Füllen der Kammern mit entsprechenden Echinacin-Konzentrationen (je 2 pro Konz.; 2 x Leerwert, 2 x mit Chemotaktikum)

III Vorinkubation (Versuchsreihe E III)

Das nach 2.2.1 erhaltene Zellpellet wurde mit Medium resuspendiert und auf eine Zellzahl von 1,1 - 1,3/nl eingestellt.

- Herstellen von verschiedenen Echinacin-Konzentrationen: 0,1 ml der Konzentrationen 500 µg/ml, 50 µg/ml usw. bis 0,05 µg/ml auf 0,9 ml Zellsuspension.
- Leerwert, CT-Referenz: 0,1ml Medium auf 0,9 ml Zellsuspension.

Resultierende Zellkonzentration: 0,9 - 1,2 Zellen/nl, Inkubationskonzentrationen für Echinacin in µg/ml: 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005; 0,0005.

Nach Verschluß mit Parafilm erfolgte die Inkubation (37°C für 15 Min.).

IV Inkubation in der Boyden-Kammer

E I + E II: Die auf 0,9 - 1,1 Zellen/nl eingestellte Suspension wurde in die vorbereiteten Versuchskammern einpipettiert.

E III: unmittelbar nach Beendigung der Vorinkubation wurden die Zellsuspensionen einpipettiert. Anschließend wurden die Versuchskammern mit einer Haftetikette verschlossen und bei 37°C für 30 min inkubiert.

V Versuchsauswertung siehe 2.2.2 V

VI Methodische Fehler und VII Statistische Auswertung siehe 2.2.2 VI, VII und 2.4 methodische Diskussion zur Chemotaxis

3.2.3 Chemilumineszenz

Die nach 2.2.1 isolierten Granulozyten wurden im Biolumaten mit Echinacin unter verschiedenen Bedingungen untersucht:

Versuchsreihe E1 : Die Zellen wurden 10 Minuten mit Echinacin vorinkubiert (Echin.-Proben bei -20° C aufbewahrt) , dann opsonisiertes Zymosan zugegeben und die Reaktion über 1/2 h beobachtet.

Versuchsreihe E2 : wie E1, jedoch wurden hier frisch hergestellte Echinacin-Konzentrationen verwendet.

Versuchsreihe E3 : Die Zellen wurden 1h mit Echinacin vorinkubiert, dann 1:10 verdünntes Zymosan zugegeben (suboptimale Stimulation) und die Reaktion über 1/2 h beobachtet.

MATERIALIEN UND GERÄTE

7 gesunde Spender (4 weibl., 3 männl., Durchschnittsalter 29 Jahre) nahmen an den Versuchen teil und spendeten 12 Proben zu je 4 ml EDTA-Blut (Entnahmezeit jeweil 10°° Uhr), die sich wie folgt verteilten:

- 5 Proben zu E1
- 2 Proben zu E2
- 5 Proben zu E3
- Echinacin-Ampullen zu 2 ml wurden freundlicherweise v. der Firma Dr. Madaus & Co zur Verfügung gestellt.
- sonstige Materialien und Geräte siehe 2.2.3

I Herstellen der Stammlösungen

E1, E2 und E3 : 33,5 µl der Originallösung in 5 ml Puffer verteilen = EA; 0,05 ml EA in 5 ml Puffer verdünnen = EB

II Versuchsvorbereitung siehe 2.2.3, II
III Versuchsdurchführung siehe 2.2.3, III
zusätzliche Änderung bei E3 : 1 Stunde Vorinkubation

PIPETTIERSCHEMA zu E1 und E3
- Mengen in µl -

Nr.	Puffer	Luminol	Lösungen	
1	500	50	--	Leerwert
2	510	50	10 EA	Echin. 5 µg/ml o.Zymos.
3	400	50	100 EA	Echin. 50 µg/ml
4	490	50	10 EA	Echin. 5 µg/ml
5	400	50	100 EB	Echin. 0.5 µg/ml
6	490	50	10 EB	Echin. 0.005 µg/ml

PIPETTIERSCHMEMA zu E3

wie bei E1/E2, hier in Kammer 2 10 µl Echinacin^{R}, das entspricht ca 700 µg/ml

IV Statistische Auswertung

Das mathematische Modell der Versuchsanordnung ist die Entnahme von mehreren verbundenen Stichproben aus einer Grundgesamtheit. Die statistische Auswertung erfolgt mit der Varianzanalyse für verbundene Variabeln bzw. dem T-Test für 2 verbundene Variabeln. Die Fragestellung ist zweiseitig.

3.3 E r g e b n i s s e

3.3.1 Granulozytenisolierung siehe 2.2.1

3.3.2 Chemotaxis

Versuchsreihe E I: Versuche E_1 - E_{12}

Tabelle 7 a) und 8 b) sowie die Schaubilder 8, 12 (CT-Faktor bei optimaler Echinacin-Konzentration im Vergleich mit CT-Referenzsubstanz) und 10 zeigen die CT-Faktoren, die sich bei der Stimulation der PMN's mit Echinacin (tiefgefrorene Proben) als Chemotaktikum ergaben. Jeder Versuch wurde doppelt durchgeführt. Die CT-Faktoren unterscheiden sich durchschnittlich um 0.45 (0.0 - 1.2; s = 0.34)
Die durchschnittliche Leukozytenzahl bei den Spendern betrug 6.1 Zellen/nl (n = 11, s = 2.6)

Versuchsreihe E II: Versuche e_1 - e_{11}

Tabelle 9 a) und 10 b) zeigen die CT-Faktoren, die sich bei Stimulation mit frisch hergestellten Echinacin-Konzentrationen ergeben. Die Ergebnisse sind in den Schaubildern 9 und 10 graphisch dargestellt. Die Ergebnisse der Doppelversuche unterscheiden sich um 0.43 (0.0 - 1.4; s = 0.35).
Die durchschnittliche Leukozytenzahl betrug 6.0 Zellen/nl (n = 11, s = 2.5).

Tabelle 7

Versuche E_1 - E_{12} mit Echinacin als Chemotaktikum

- tiefgefrorene Proben -

a) CT-Faktoren (Konzentrationen in µg/ml)

- Mittelwerte aus je 2 Versuchen -

V-Nr.	5000	500	50	5	0.5	0.05	CT-Standard+
E_1	1.7	2.0	2.9	---	---	---	---
E_2	1.4	1.2	1.8	1.0	---	---	3.6
E_3	1.2	1.8	2.5	4.4	1.5	---	6.3
E_4*	4.0	7.0	17.5	3.8	4.0	---	20.0
E_5	4.0	4.8	6.8	3.8	3.2	---	18.0
E_6	4.0	5.5	6.7	3.0	3.3	---	25.0
E_7	1.7	2.9	5.0	1.9	1.6	---	12.0
E_8	2.1	1.4	3.5	1.7	1.4	---	9.6
E_{11}	---	1.0	2.4	2.8	1.3	1.0	5.1
E_{12}	---	1.3	1.4	6.0	1.2	0.9	12.7
n	8	10	10	9	8	--	9
$\bar{x}$	2.5	3.0	5.1	3.2	2.2	--	12.5
s	1.3	2.3	4.8	1.5	1.1	--	7.3

+ = N-f-Met-Leu-Phe 10^{-6}mol; * = Vers.person mit Leukozytopenie 2.7 Zellen/nl; V E_5+E_6= gleiche Vers.person; V E_9+E_{10} = Fehlversuche.

Tabelle 8

Versuche E_1 - E_{12} mit Echinacin als Chemotaktikum

- tiefgefrorene Proben -

b) %-Werte des CT-Standards (N-f-Met-Leu-Phe 10^{-6}mol)

- Konzentrationen in µg/ml -

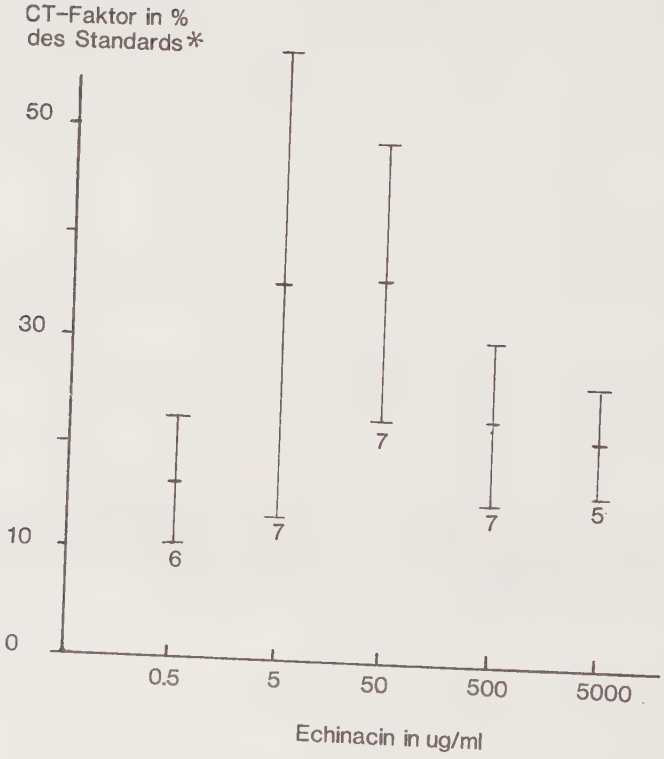
V - Nr.	5000	500	50	5	0,5
E_2	38	33	50	27	--
E_3	19	28	39	69	23
E_6	16	22	27	12	13
E_7	14	24	42	16	13
E_8	20	15	36	18	15
E_{11}	--	20	46	55	25
E_{12}	--	11	11	47	9
n	5	7	7	7	6
$\bar{x}$	21	22	36	35	16
s	9.6	7.5	13	22	6.3
E_4	20	35	88	19	20
E_5	22	32	36	21	17

E_4 und E_5 bei statistischer Auswertung nicht berücksichtigt (Leukozytopenie E_4; gleiche Versuchsperson bei E_5 und E_6)

Schaubild 8

CT-Faktor nach Stimulation mit Echinacin^{R}

-tiefgefr. Proben-



* 10^{-6} mol N-f-Met-Leu-Phe

Tabelle 9

Versuche mit Echinacin als Chemotaktikum e_1-e_{11}

- frisch hergestellte Proben -

a) CT-Faktoren - Mittelwerte aus 2 Versuchen -
(Echinacin-Konzentrationen in µg/ml)

V-Nr.	500	50	5	0,5	0,05	CT-Standard *
e 1	1.8	2.8	5.3	1.6	1.3	9.8
e 2	2.5	4.9	9.9	3.0	2.8	21.5
e 3		2.7	5.5	2.5	1.9	11.6
e 4		2.6	3.5			10.4
e 5		3.3	2.9			11.5
e 6		5.5	10.0			12.0
e 7		5.6	6.6	5.1	3.6	8.7
e 8		20.0	10.3			21.1
e 9		9.0	15.3			22.6
e 10		3.5	4.5			10.6
e 11		5.0	3.9			11.1
n		11	11	4	4	11
$\bar{x}$		5.9	7.0	3.1	2.4	13.7
s		5.0	3.8	1.5	1.0	5.2

* = N - f - Met - Leu - Phe 10^{-6} mol

Tabelle 10

Versuche mit Echinacin als Chemotaktikum e_1-e_{11}

- frisch hergestellte Proben -

b) CT-Faktoren in % des CT-Standards *
(Echinacin-Konzentrationen in µg/ml)

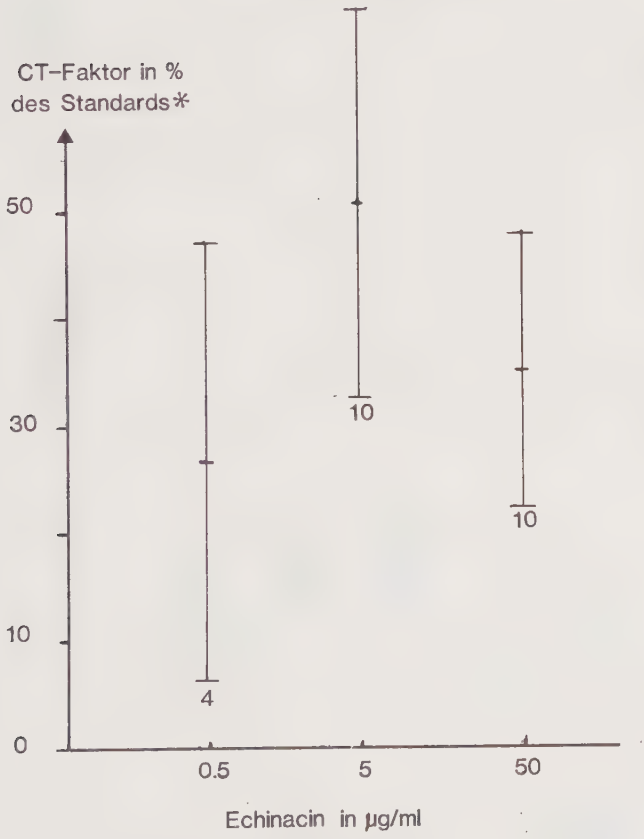
V-Nr.	500	50	5	0.5	0.05
e 1	29	28	54	16	13
e 2	12	23	44	14	13
e 3		23	47	21	16
e 4		25	34		
e 5		28	25		
e 6		46	83		
e 7		64	75	58	41
e 9		40	68		
e 10		33	44		
e 11		45	35		
n		10	10	4	
$\bar{x}$		35,5	50,9	27,3	
s		13,2	18,9	20,7	
e 8		94	49		

* = N - f - Met - Leu - Phe 10^{-6} mol

Schaubild 9

CT-Faktor nach Stimulation mit Echinacin R

-frisch hergest. Proben-



* 10^{-6} mol N-f-Met-Leu-Phe

Schaubild 10

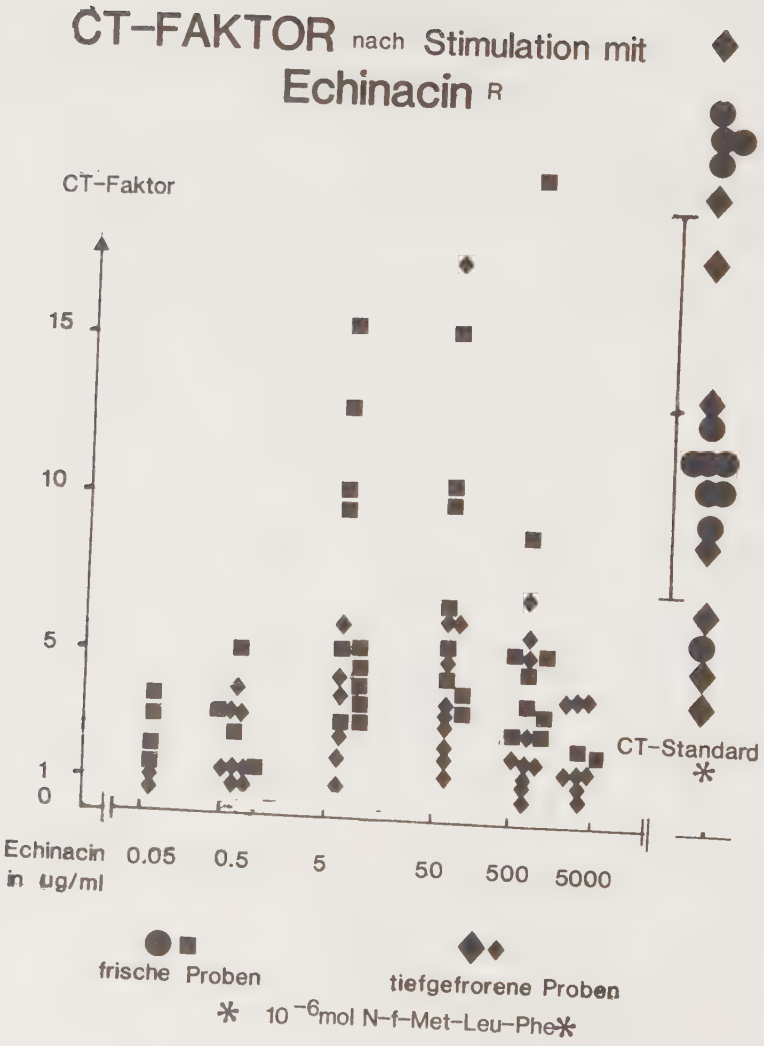


Tabelle 11

Versuche mit Echinacin als Chemotaktikum
Gesamtversuche E 2 - E 12, e 1 - e 11

CT-Faktoren in % des CT-Standards *
(Echinacin-Konzentrationen in µg/ml)

	5000	500	50	5	0.5
n	5	11	20	20	12
$\bar{x}$	21.0	23.7	41.2	42.1	20.3
s	9.6	8.5	20.7	21.0	12.7

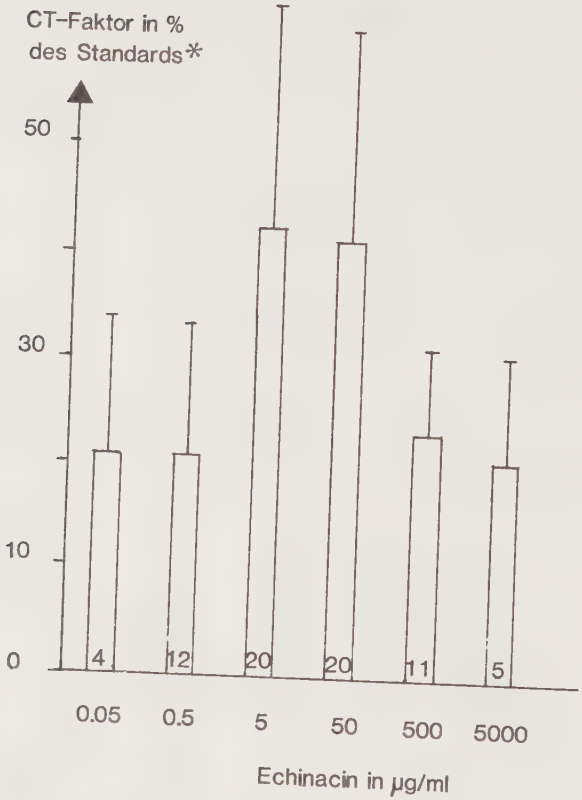
* = N - f - Met - Leu - Phe 10^{-6} mol

Der durchschnittliche CT-Faktor des CT-Standards betrug: 13.2 (n= 20, s= 6.1)

Schaubild 11

- Zusammenfassung -

CT-Faktor nach Stimulation mit Echinacin^{R}



* 10^{-6} mol N-f-Met-Leu-Phe

Tabelle 12

Versuche mit Echinacin als Chemotaktikum
Maximalwert/Versuchsansatz (peak) im Vergleich zum jeweiligen CT-Standard-Wert
(Echinacin-Konzentrationen in µg/ml)

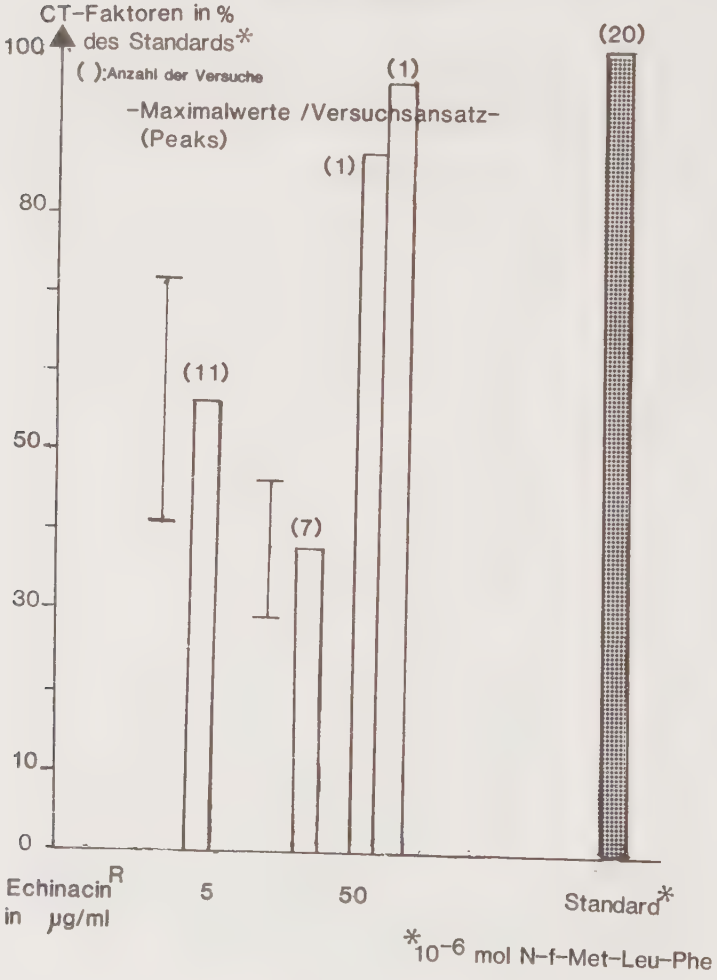
	CT-Faktoren (Ø Wert aus 2 Vers.)		CT-Faktoren in % des CT-Standards *	
V.-Nr.	5	50	5	50
E 2		1.8		50
E 3	4.4		69	
E 5		6.8		36
E 6		6.7		27
E 7		5.0		42
E 8		3.5		36
E 11	2.8		55	
E 12	6.0		47	
e 1	5.3		54	
e 2	9.9		44	
e 3	5.5		47	
e 4	3.5		34	
e 5		3.3		28
e 6	10.0		83	
e 7	6.6		75	
e 9	15.3		68	
e 10	4.5		44	
e 11		5.0		45
$\bar{x}$	6.7	4.6	56.4	37.7
s	3.7	1.8	15.3	8.5
E 4/e 8		17.5/20.0		88/94

* = N - f - Met - Leu - Phe 10^{-6} mol

Schaubild 12

-Häufigkeit der individuellen Peaks-

CT-Faktor nach Stimulation mit Echinacin^{R}



Versuchsreihe E III: Versuche ei_1- ei_{12}

In Tabelle 13 und 14 sind die CT-Faktoren aufgezeichnet, die nach Vorinkubation mit Echinacin und anschließender Stimulation mit der Referenzsubstanz NMLP 10^{-6} molar resultierten. Zum Vergleich sind die jeweiligen Kontrollwerte (ohne Vorinkubation, Vorinkubation im Medium) mit berücksichtigt.

Die Schaubilder 13, 14 und 15 zeigen jeweils eine graphische Übersicht.

Der durchschnittliche Fehler des CT-Wertes betrug o.45 (0.0 - 1.3 Streuuung, s = 0.34), die Leukozytenzahl 6.2 Zellen/nl (n = 12, s = 2.7)

Tabelle 13

Versuche ei_1 - ei_{12} mit Vorinkubation (15 Min.) von Echinacin und nachfolgender Stimulation mit CT-Standard*

a) CT-Faktoren - Durchschnittswerte aus 2 Versuchen -
- Echinacin-Konzentrationen in µg/ml -

V.-Nr.	50	5	0.5	0.05	0.005	Kontr.	Kontr. o. Inkub.
ei 2	9.1	11.0	10.0	6.2	-.-	6.1	11.6
ei 3	9.2	10.0	9.0	8.2	6.6	6.9	10.4
ei 5	7.2	9.6	6.5	7.0	-.-	7.3	8.8
ei 6	11.1	18.9	15.6	14.3	16.0	15.5	21.1
ei 7	12.8	17.9	11.8	10.7	10.1	15.3	22.6
ei 8	6.9	5.8	8.9	4.8	4.0	5.9	10.6
ei 9	15.0	10.2	11.0	5.1	-.-	9.3	11.1
ei 10	7.4	7.4	7.3	4.4	-.-	4.6	5.6
ei 11	12.2	9.8	9.8	6.7	-.-	9.0	10.6
ei 12	7.0	9.4	5.9	8.1	-.-	7.8	7.4
n	10	10	10	10	4	10	10
$\bar{x}$	9.8	11.0	9.6	7.6		8.8	12.0
s	2.9	4.1	2.8	3.0		3.8	5.5
ei 1	15.3	16.4	5.6	8.7		16.0	21.5
ei 4	30.8	20.3	23.1	14.6		10.7	12.0

* N-f-Met-Leu-Phe 10^{-6}mol; stat. Auswertung: T-Test für verbundene (paarige) Stichproben: Kontrolle/Kontr. ohne Inkubation (einseitig): p = 0.005; Kontrolle/Echinacin 5 µg/ml (zweiseitig): p = 0.005.

Schaubild 13

CT-Faktoren nach 15 min Inkubation mit Echinacin^{R}

nachfolgend Stimulation mit 10^{-6}mol N-f-Met-Leu-Phe

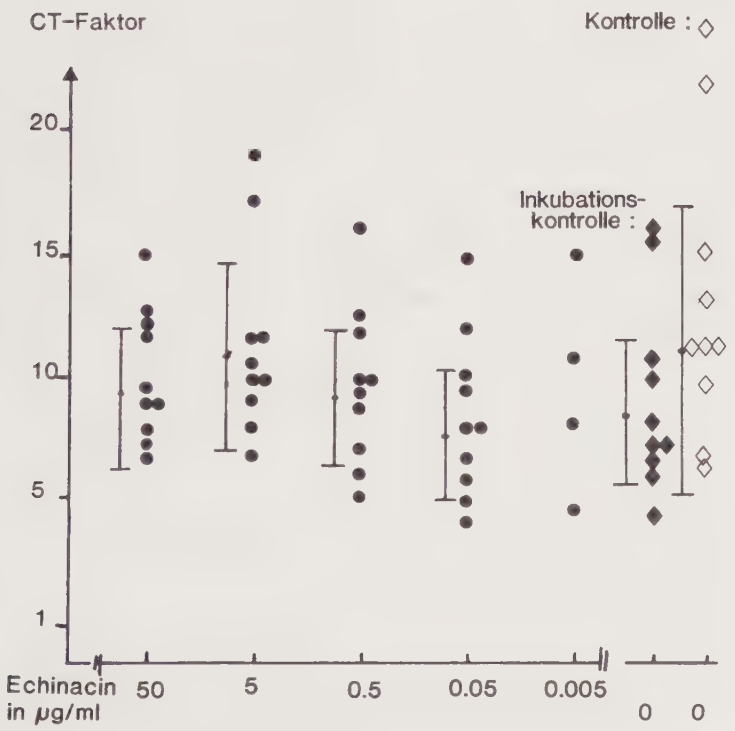


Tabelle 14

Versuche ei_1- ei_{12} mit Vorinkubation (15 Min.) von Echinacin und nachfolgender Stimulation mit CT-Standard*

b) CT-Faktoren in % der Inkubationskontrolle
CT-Faktoren der Inkubationskontrolle in % der Kontrolle ohne Inkubation
-Echinacin-Konzentrationen in µg/ml-

V-Nr.	50	5	0.5	0.05	0.005	Inkubations-kontrolle
ei 2	149	180	164	102		53
ei 3	133	145	130	119	95	66
ei 5	99	132	90	96		83
ei 6	72	122	100	92	103	73
ei 7	84	117	77	70	67	68
ei 8	117	99	151	82	69	57
ei 9	160	110	119	57		84
ei10	160	161	159	96		82
ei11	136	109	109	75		85
ei12	90	121	76	104		106
n	10	10	10	10		10
$\bar{x}$	120	130	118	89	84	76
s	32	25	33	18	18	17
ei 1	96	103	32	54		25
ei 4	280	190	216	136	110	11

* = N-f-Met-Leu-Phe 10^{-6} mol

Tabelle 15

Versuche ei_1 - ei_{12} mit 15 Min. Vorinkubation von Echinacin und nachfolgender Stimulation mit CT-Standard (N-f-Met-Leu-Phe 10^{-6}mol)

d) CT-Faktoren in % der Kontrolle ohne Inkubation
- Echinacin-Konzentrationen in µg/ml -

V-Nr.	50	5	0.5	50	5	0.5	Inkub.Kontrolle
ei 2	79	95	87	./.	--	./.	./.
ei 3	88	96	87	./.	--	--	./.
ei 5	82	114	102	./.	--	./.	./.
ei 6	52	89	73	./.	./.	./.	./.
ei 7	56	80	52	./.	./.	./.	./.
ei 8	66	55	84	./.	./.	./.	./.
ei 9	135	92	99	+	--	--	./.
ei 10	132	132	130	+	+	+	./.
ei 11	115	93	93	+	--	--	./.
ei 12	95	127	80	--	+	./.	--
n	10	10	10				
$\bar{x}$	90	97	89				
s	29	23	20				

CT-Werte vom Vergleichswert (Kontr.o.Inkub.) verschieden mit p = 0.005 unter Berücksichtigung des Bestimmungsfehlers;
+ = signifikant höher
./. = " " niedriger
-- = kein signif. Unterschied
(einseitige Fragestellung)

Schaubild 14

CT-Faktoren nach 15 Min INKUBATION mit ECHINACIN ®

nachfolgend Stimulation mit 10^{-6} mol N-f-Met-Leu-Phe

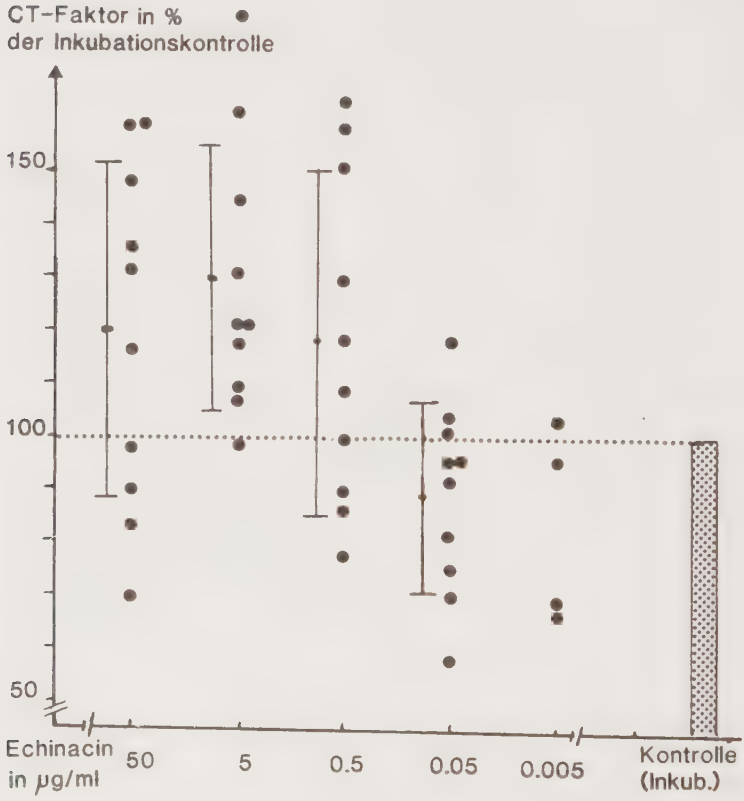


Tabelle 16

Versuche ei_2 - ei_{12} mit Vorinkubation (15 min) von Echinacin und nachfolgender Stimulation mit CT-Standard⊕

c) Vergleich der CT-Werte bei Echinacin-Inkubation mit der Inkubationskontrolle (Medium) unter Berücksichtigung des Fehlers bei der CT-Faktor-Bestimmung*

V-Nr.	50	5	0.5	0.05	(Echinacin in µg/ml)
ei_2	+	+	+	--	
ei_3	+	+	+	--	
ei_5	--	+	0.05^-	--	
ei_6	-	+	--	--	
ei_7	-	+	-	-	
ei_8	0.05^+	--	+	--	
ei_9	+	0.05^+	+	-	
ei_{10}	+	+	+	--	
ei_{11}	+	+	+	-	
ei_{12}	-	+	-	--	
ei_1	--	--	-	-	
ei_4	+	+	+	+	

⊕ = N-f-Met-Leu-Phe 10^{-6} mol

* = $\pm$ 0.46 mit s = 0.35; Signifikanzniveau p= 0.005, d.h. Differenz d.CT-Werte Echinacin/Kontr. > 3s = 1.1; mit p= 0.05 Werte-Differenz 2s - 3s = 0.7 - 1.1

+ = Echinacin-Wert > Kontr.; - = E.-Wert < Kontr.

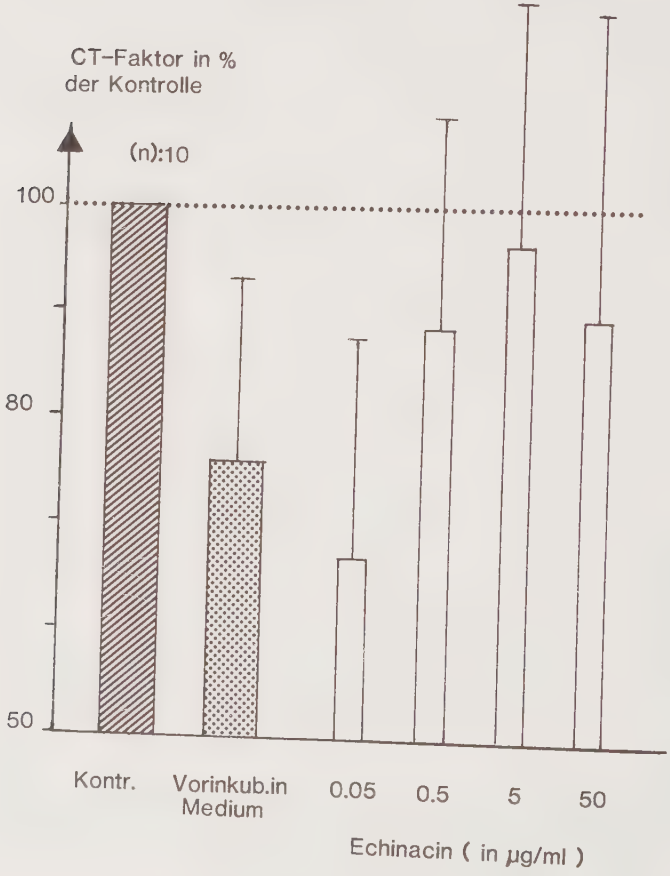
-- = kein signifikanter Unterschied; p= 0.005 (abweichende p-Werte aufgeführt)

Schaubild 15

CT-Faktoren nach 15 min Inkubation mit Echinacin®

im Vergleich mit Kontrolle (o.Vorinkub.)

nachfolgend Stimulation mit 10^{-6} mol N-f-Met-Leu-Phe



3.3.3 Chemilumineszenz

Versuchsreihe E1 und E2 (Versuche CE_1 - CE_5; Ce_{1+2})

Tabelle 17 zeigt die Versuchsergebnisse bei 10 Min. Vorinkubation mit Echinacin. Es sind nur die Peaks berücksichtigt; die Integration aller Counts (Flächeninhalt der Kurven) zeigt keine Unterschiede.

Tabelle 17

Chemilumineszenz-Versuche mit Echinacin - 10 Min. Vorinkubation. Peaks der Versuche CE_1-CE_5 u. Ce_1 + Ce_2 in 10^3 CPM (Counts/min)

- Echinacin-Konzentrationen in µg/ml -

V-Nr.	50	5	0.5	0.05	Kontrolle
CE_1	6.5	7.2	5.8	6.4	6.0
CE_2	5.0	5.5	5.4	4.9	4.8
CE_3	9.4	9.0	9.2	9.8	8.0
CE_4	4.4	3.8	4.9	5.3	4.0
CE_5	7.0	7.3	6.5	5.8	6.0
Ce_1	6.3	7.3	6.6	6.4	6.4
Ce_2	7.4	7.9	8.2	7.6	7.3
$\bar{x}$	6.6	6.9	6.7	6.6	6.1
s	1.7	1.7	1.7	1.7	1.4

Die Versuchsergebnisse Kontrolle/Echinacin 5 µg/ml unterscheiden sich signifikant ($p = 0.01$; T-Test für verbundene Stichproben, zweiseitige Fragestellung), die Ergebnisse Kontr./Echin. 50 µg/ml unterscheiden sich schwach signifikant ($p = 0.05$).

Versuchsreihe E3 (Versuche Cei_1 - Cei_5)

Tabelle 18 zeigt die Versuchsergebnisse nach 1 Std. Vorinkubation mit Echinacin. Hier sind die Peaks der Kurven aufgeführt, in Tabelle 19 die Flächeninhalte (Integrale der Kurven).
Schaubild 16 zeigt eine graphische Übersicht.

Tabelle 18

Chemilumineszenz-Versuche mit Echinacin: 1 h Vorinkub., Stimulation mit 1 : 10 verd. opson. Zymosan
Peaks der Versuche Cei_1 - Cei_5 in 10^3 CPM (Counts/min)
- Echinacin-Konzentrationen in µg/ml -

V.-Nr.	700	50	5	0.5	0.05	Kontrolle
Cei_1	1.39	1.96	1.61	1.54	1.66	1.38
Cei_2	2.08	2.83	2.88	2.59	2.40	2.29
Cei_3	2.29	2.16	2.72	2.49	2.20	2.29
Cei_4	1.08	1.24	1.02	1.31	1.02	0.98
Cei_5	1.13	2.34	1.65	1.74	1.94	1.86
$\bar{x}$	1.60	2.11	1.98	1.93	1.85	1.76
s	0.56	0.58	0.79	0.58	0.54	0.58

Die Versuchsergebnisse Kontrolle/Echin. 50 µg/ml unterscheiden sich signifikant (p = 0.01; T-Test f. verbundene Stichproben, zweiseitige Fragestellung)

Versuchsergebnisse aus Tab. 18 in % der Kontrolle:

	700	50	5	0.5	0.05
$\bar{x}$ =	93	124	110	114	106
s =	19	18	16	15	9

Tabelle 19

Chemilumineszenz-Versuche mit Echinacin: 1 h Vorinkub., Stimulation mit 1 : 10 verd. opson. Zymosan
Flächeninhalte der Kurven in 10^4 CPM (Counts/min)
- Echinacin-Konzentrationen in µg/ml -

V.-Nr.	700	50	5	0.5	0.05	Kontr.
Cei_1	6.40	8.18	7.72	7.69	7.88	7.11
Cei_2	5.31	6.94	6.81	6.94	5.93	5.91
Cei_3	6.01	6.26	6.98	6.65	6.01	5.99
Cei_4	3.12	4.00	2.88	3.94	3.35	3.12
Cei_5	3.09	5.58	4.22	4.74	5.07	4.85
$\bar{x}$	4.8	6.2	5.7	6.0	5.6	5.4
s	1.6	1.6	2.1	1.6	1.6	1.6

Die Versuchsergebnisse Kontr./Echin. 50 µg/ml unterscheiden sich signifikant ($p = 0.01$; T-Test für verbundene Stichproben, zweiseitige Fragestellung).

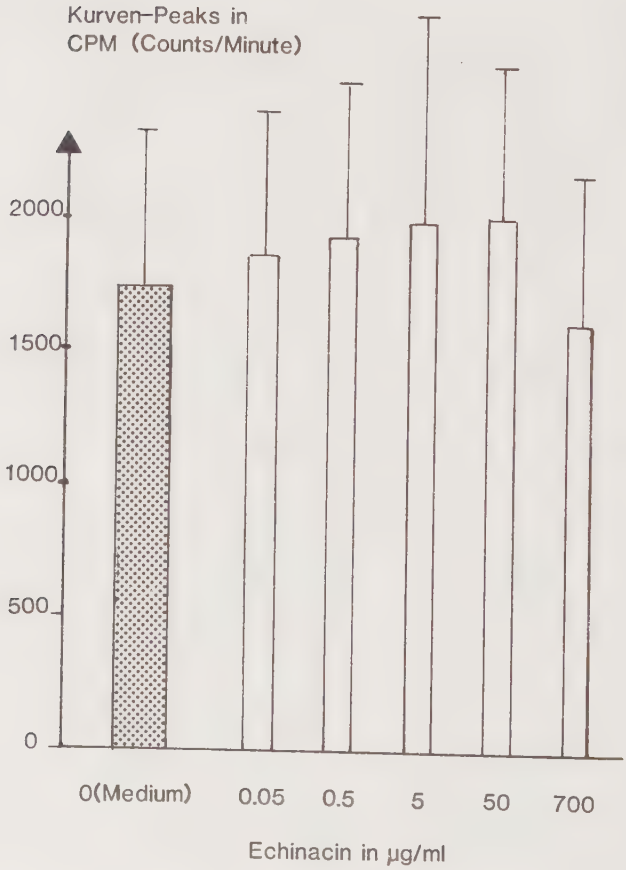
Versuchsergebnisse aus Tab. 19 in % der Kontrolle:

	700	50	5	0.5	0.05
$\bar{x}$ =	89	116	104	112	105
s =	15	8	13	11	5

Schaubild 16

Chemilumineszenz nach 60 min Vorinkub. mit **Echinacin**[R]

suboptimale Stimul. mit opson. Zymosan (1:10 verd.)



(n) : 5 pro Versuchsreihe

3.4 Diskussion

Über eine abwehrsteigernde oder immunstimulierende Wirkung von Echinacea-Präparaten, insbesondere des standardisierten Präparates Echinacin^{R}, liegen zahlreiche klinische Berichte vor. Auch sprechen eine Reihe von experimentellen Daten dafür, daß Echinacin an verschiedenen Angriffspunkten innerhalb des komplexen Immunapparates angreift (siehe 3.1).

In den vorliegenden Experimenten wurde untersucht, ob Echinacin die Chemotaxis von Granulozyten gesunder Spender beeinflußt. Um Veränderungen in der bakteriziden Kapazität von PMN's gesunder Spender zu ermitteln, wurde mit der Chemilumineszenz-Methode die O_2-Radikal-Bildung unter Einfluß von Echinacin gemessen.

Ebenso wie bei den Versuchen mit Histamin und Ascorbinsäure erwies sich die Percoll-Methode zur Granulozyten-Isolierung bei den Untersuchungen mit Echinacin als sehr schonend: Die Granulozyten zeigten eine hohe chemotaktische Aktivität (CT-Faktor bei Stimulation mit NMLP 10^{-6} mol: 12.4; n = 33, s = 5.8). Weitere methodische Bemerkungen zur angewandten Chemotaxis- bzw. Chemilumineszenz-Technik siehe 2.4.

Die Versuchsreihe E I (Proben von Echinacin, die bei -20°C aufbewahrt worden waren, als Chemotaktikum im Vergleich mit einer Referenzsubstanz) zeigte, daß Echinacin chemotaktisch aktiv ist mit einer deutlichen Dosis-Wirkungsbeziehung. Alle chemotaktisch aktiven Substanzen lassen bei einer bestimmten Konzentration einen deutlichen Wirkungsgipfel erkennen. Das Wirkungsoptimum des hier verwendeten CT-Standards N-f-Met-Leu-Phe liegt unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen bei 10^{-6} mol. (42)

Der Wirkungsgipfel für Echinacin lag bei 50 µg/ml bzw. bei 5 µg/ml, wobei der beobachtete Effekt 36% bis 88% des Referenzchemotaktikums (NMLP 10^{-6}molar) betrug. Der durchschnittliche Wert der CT-Faktoren für 50 µg/ml bzw. 5 µg/ml war 5.1 bzw. 3.2 (n = 10 bzw. 9, s = 4.8 bzw. 1.5) und 36% bzw. 35% (n = 7 bzw. 7, s = 13 bzw. 22) bei Vergleich mit dem CT-Standard.

Die Versuchsreihe E II (frisch verdünnte Echinacin-Proben als Chemotaktikum) ergab Resultate, die denen von E I analog sind: Ein deutlicher Wirkungsgipfel bei 5 µg/ml (1 x bei 50 µg/ml) mit einem durchschnittlichen CT-Faktor von 7.0 (n = 11, s = 3.8), das entspricht einer durchschnittlichen Relation zum CT-Standard von 50,9% (n = 10, s = 18.9).

Versuch E_4 (Reihe E I) zeigt eine bemerkenswerte Einzelbeobachtung: bei einer Spenderin, die eine Leukozytenzahl von 2,7/nl aufwies, war eine sehr hohe chemotaktische Aktivität von 20 feststellbar: Gleichzeitig konnte mit einer Stimulation durch die Echinacin-Konzentration 50 µg/ml ein CT-Faktor von 17,5 erreicht werden, das entspricht 88% des Kontrollwertes. Möglicherweise ist der niedrige Leukozytenwert nur Ausdruck einer Relationsänderung zwischem dem zirkulierenden und dem marginierten Zellpool (siehe 1.3). Es könnte sein, daß bei dieser Spenderin nur eine aktivere Subpopulation erfaßt wurde, die auf Stimulation mit Echinacin empfindlicher reagiert ("high responder" - Zellen ?).
Eine ähnlich hohe chemotaktische Aktivität von 50 µg/ml Echinacin im Vergleich mit dem CT-Standard weist auch Versuch e_8 (Reihe E II) auf mit einem CT-Faktor von 20,0, das entspricht 94% des Standards. Hier lag allerdings keine Leukozytopenie vor (5,7 Zellen/nl).

Bei der Bestimmung des CT-Faktors tritt ein Fehler von 0.46 mit s = 0.35 auf. Ein merklicher chemotaktischer Effekt besteht erst ab einem Faktor von 2.0. Deshalb ergibt sich für Faktoren unter 2.7 keine, für Faktoren von 2.7 bis 3.1 ($\hat{=}$ 2s - 3s) ein schwacher (p = 0.03) und für Faktoren über 3.1 ein deutlicher (p = 0.001) chemotaktischer Effekt der zu untersuchenden Substanz. Bei dieser Einteilung ist bei einem Versuch kein, bei 2 Versuchen ein schwacher und bei 18 Versuchen der Reihen E I und E II ein signifikanter chemotaktischer Effekt von Echinacin zu beobachten.

Wie andere Chemotaktika, so weist auch Echinacin einen konzentrationsabhängigen Wirkungsgipfel auf. Dieser Effekt führt bei der lokalen Applikation dazu, daß die Granulozyten in der Umgebung dort aktiviert werden, wo die für sie optimale stimulierende Konzentration herrscht. So ließe sich die vielfach beobachtete gute Wirkung der Echinacin-Salbe bei lokalen entzündlichen Veränderungen der Haut erklären (3, 75, 105).

In Vorversuchen zur Chemotaxis mit Echinacin-Konzentrationen über 500 µg/ml konnten keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden, weil die Zellen bei der mikroskopischen Auswertung kaum erkennbar waren. Dies kann eine direkte Schädigung der Zellen durch hohe Echinacin-Konzentrationen zur Ursache haben, oder durch Interferenzen mit den Färbemedien ausgelöst worden sein.

Die in den Versuchen verwendeten Echinacin-Konzentrationen im Bereich von 500 µg/ml bis 0,005 µg/ml erscheinen zunächst sehr gering, doch zeigen einige Modellrechnungen zur Pharmakodynamik, daß der gewählte Konzentrationsbereich durchaus mit den Plasmaspiegeln vergleichbar ist,

die bei der Anwendung von Echinacin laut Herstellerangaben erzielbar sind: Pharmaka verteilen sich in verschiedenen pharmakologischen Kompartimenten (90). Zwei extreme hypothetische Verteilungsräume seien hier berücksichtigt: zum einen das Blut-Plasma = ca. 4 l, zum anderen das Gesamtkörperwasser = ca. 40 l (166) (dies gilt nur für wasserlösliche Stoffe, bei lipophilen Substanzen können sehr viel größere oder kleinere pharmakologische Verteilungsräume auftreten). Eine weitere Annahme sei, daß bei i.v.-Injektion sich das Pharmakon gleichmäßig auf sein entsprechendes Kompartiment verteilt, ohne daß metabolische Prozesse zusätzlich einwirken. Zwei Applikationsmengen seien angenommen:
1. 0,2 ml Echinacin (10 mg Ursubstanz),
2. 4,0 ml Echinacin (200 mg Ursubstanz).

Es ergeben sich für die Kombination 0,2 ml Echinacin i.v. verteilt auf das Gesamtkörperwasser eine Konzentration von 250 µg/ml und für die Kombination 4,0 ml Echinacin / Blutplasma 50 µg/ml. Die so errechneten Konzentrationen sind Maximalwerte, die infolge Eliminierung und Metabolisierung nicht erreicht werden. Wie die Modellrechnung zeigt, könnten die im Versuch verwendeten Konzentrationen durchaus den Bedingungen in-vivo entsprechen. Bei Versuchen zur Virushemmung durch Echinacea wurden vergleichbare Konzentrationen (2.5 - 20 µg/ml) verwendet (194). Ob bei oraler Anwendung hoher Dosen ("Stoßtherapie") oder bei lokaler Applikation andere Konzentrationen entstehen, kann mit den oben ausgeführten Modellen nicht errechnet werden.

Bei der Versuchsreihe E III erlitten die PMN's durch eine 15 min. Vorinkubation in neutralem Medium eine Aktivitätseinbuße von durchschnittlich 24 % (n = 10, s = 17); der CT-Faktor ohne Inkubation betrug 12 (n = 10; s = 5.5), nach Inkubation fiel er auf 8.8 (n = 10, s = 3.8). Diese Aktivitätsminderung wurde durch Vorinkubation mit Echinacin aufgehoben; zum Teil waren die Zellen sogar aktiver als bei der Kontrolle ohne Inkubation (bei der optimalen Konzentration von 5 µg/ml betrug der CT-Faktor 130 % im Vergleich zur Inkubationskontrolle (n = 10, s = 25), und 97 % im Vergleich zur Kontrolle ohne Inkubation (n = 10, s = 23). (Vgl. Tab. 13 + 14, Schaubild 13, 14 + 15).

Die statistische Auswertung mit dem T-Test für zwei abhängige Variabeln ergab, daß sowohl die Aktivitätsminderung mit p = 0.005 als auch der diese Einbuße aufhebende Effekt von 5 µg/ml Echinacin mit p = 0.005 hoch signifikant war (Vgl. Tab. 13, Schaubild 15).

Unter Berücksichtigung des CT-Faktor-Fehlers (siehe oben) ergibt sich bei allen 10 ausgewerteten Versuchen, daß die CT-Faktoren bei Inkubation mit 5 bzw. 50 µg/ml Echinacin signifikant (p = 0.005) über der Inkubationskontrolle liegen. Die Aktivitätseinbuße beim Vergleich Inkubationskontrolle/Kontrolle ohne Inkubation war bei 9 von 10 Versuchen signifikant (p = 0.005). Bei 7 von 10 Versuchen ergaben die Echinacin-Konzentrationen 5 bzw. 50 µg/ml gleiche oder höhere Werte wie die Kontrolle ohne Inkubation (bei Berücksichtigung des Bestimmungsfehlers p = 0.005) (Vgl. Tab. 15 + 16).

Bei den Versuchsreihen der Chemilumineszenz E1 und E2 wurden die Granulozyten 10 Min. mit Echinacin vorinkubiert und mit opsonisiertem Zymosan stimuliert. Im Vergleich mit dem Peakwert der Kontrolle von 6.1 • 10^3CPM (n = 7, s = 1.4) lagen die Werte für 5 und 50 µg/ml Echinacin um ca 13% höher (6.9 • 10^3CPM (n = 7, s = 1.7, p = 0.01) bzw. 6.6 • 10^3CPM (n = 7, s = 1.7, p = 0.05) (Vgl. Tab.17).
Dieser Effekt war auch bei E3 nach 60 Min. Vorinkubation und suboptimaler Stimulation mit Zymosan noch deutlicher zu beobachten. Die Granulozytenaktivität sank dabei auf Werte unter 30% der 10 Min.-Vorinkubation ab, so daß der Peakwert der Kontrolle auf 1.8 • 10^3CPM (n = 5, s = 0.58) fiel. Die mit 50 µg/ml Echinacin vorinkubierten Granulozyten zeigten eine um 24% höhere Aktivität (p = 0.01) von 2.1 • 10^3CPM (n = 5, s = 0.58), (Vgl. Tab.18 + Schaubild 16).
Auch beim Vergleich der Kurven-Integrale von E3, die ein Maß für die geleistete Arbeit, d.h. die bakterizide Kapazität, darstellen, unterscheidet sich der Echinacin-Wert von 50 µg/ml signifikant mit p = 0.01 vom Kontrollwert (6.2 • 10^4CPM (n = 5, s = 1.6) Kontrolle: 5.4 mal 10^4CPM (n = 5, s = 1.6)).

Bei E1 - E3 war wie bei den Chemotaxis-Versuchen eine Dosis-Wirkungsbeziehung zu erkennen, denn die Konzentrationen 50 µg/ml und 5 µg/ml zeigten eine auffallend stärkere Wirkung im Vergleich zu 500 µg/ml u. 0.05 µg/ml. (vgl. Schaubild 16).
Die Echinacin-Konzentrationen von 50 µg/ml und 5 µg/ml wirken demnach protektiv auf die Chemilumineszenz menschlicher Granulozyten, während die Echinacin-Konzentration 5 µg/ml einen chemotaktisch-protektiven Effekt aufweist.

Echinacin wirkt unter den verwendeten Versuchsbedingungen wahrscheinlich nicht direkt stimulierend, sondern protektiv oder möglicherweise sogar regenerativ auf die Zellfunktion. In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden

- wie lange der protektive/regenerative Effekt anhält,
- welche weiteren schädigenden Einflüsse Echinacin ausgleichen kann,
- welche der bisher isolierten Inhaltsstoffe der Echinacea (siehe 3.1.6), insbes. die in jüngster Zeit isolierten immunstimulierenden Teilfraktionen (156), an den hier beobachteten Wirkungen beteiligt sind.

Die angewandten Methoden können keine Aufschlüsse darüber geben, wie der protektive Effekt von Echinacin auf die Granulozytenfunktion zustandekommt. Einige Hypothesen zum Wirkungsmechanismus möchte ich zur Diskussion stellen:

1) Echinacin wirkt unspezifisch membranstabilisierend. Diesen Effekt findet man bei vielen Pharmaka, wie z. B. Lokalanästhetika, einige beta-Blocker, Diazepam und Clonidin.

2) Echinacin besitzt anti-oxidative Inhaltsstoffe. Es könnte die PMN's vor toxischen O_2-Derivaten schützen, ähnlich wie dies für Ascorbinsäure postuliert wird (siehe 2.1.2.2).

3) Echinacin erhält via Hyaluronidase-Inhibition den Hyaluronsäure-Spiegel aufrecht (103) und stimuliert so die Chemotaxis (in-vitro-Stimulation der Chemotaxis durch Hyaluronsäure (93)).

4) Echinacin stimuliert spezifische Chemotaxis/Chemokinese-Rezeptoren, wie z.B. Komplementfaktoren, Arachidonsäurederivate, kollagenolytische Fibroblastenprodukte und Substanzen bakterieller Herkunft (siehe 1.4, "Chemotaxis" S. 12).

5) Echinacin reagiert mit Rezeptoren, die eine Aktivierung der Zelle bewirken ("respiratory burst", "killing", vgl. 1.4, S. 13 +14).

Aus den unter 1) bis 3) beschriebenen Mechanismen ließe sich sowohl die Beobachtung, daß Echinacin chemotaktisch/chemokinetisch wirkt (E I und E II) als auch der in E III und E IV festgestellte chemotaktisch-protektive Effekt und die in E1, E2 und E3 gemessene Chemilumineszenz-protektive Wirkung herleiten.

Die gewonnenen Ergebnisse über die protektive/regenerative Funktion von Echinacin auf Granulozyten bestätigen experimentell die klinischen Erfahrungen, daß Echinacea-Präparate abwehrsteigernd wirken, d.h. daß empirische Beobachtungen mit standardisierbaren und reproduzierbaren Verfahren überprüft werden können. Meiner Meinung nach wäre mit den vorliegenden Versuchen eine Möglichkeit aufgezeigt, die Echinacea-Präparate mit einem biologischen Test zu standardisieren:

1) Bei 18 von 20 Versuchen (E I und E II) ist die Relation CT-Faktoren Echinacin/CT-Referenz (NMLP 10^{-6}mol) relativ konstant (35 % - 50 %) (die beiden restlichen Versuche sind Ausreißer oder "high responder"(?)), (Vgl. Schaubild 12, Seite 102).

2) Die protektive Funktion von Echinacin auf die Chemotaxis menschlicher Granulozyten wurde bei allen 10 ausgewerteten Versuchen festgestellt. (Vgl. Schaubild 15, S. 110).

Bei weiterer Optimierung der verwendeten Chemotaxis-Methoden ließe sich ein brauchbares in-vitro-Verfahren entwickeln, das eine Qualitätskontrolle von Echinacea-Auszügen ermöglichte. Auch die Chemilumineszenz-Aktivierung durch Echinacin könnte zur Standardisierung herangezogen werden. (Vgl. Schaubild 16)

Laut Herstellerangaben ist Echinacin gut verträglich, abgesehen von einer möglichen leichten initialen Temperaturerhöhung. Es bestehen keine Kontraindikationen, mit Ausnahme von chronisch progredienten Infektionen, wie z.B. Tbc. Wechselwirkungen mit anderen Pharmaka sind nicht bekannt. Echinacin zählt bisher pharmakologisch zu den unspezifischen Reizkörpern. Die hier durchgeführten Versuche sollten dazu beitragen, spezifische Wirkungen von Echinacin auf neutrophile Granulozyten zu erforschen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Echinacin in den vorliegenden Versuchen als Chemotaktikum/Chemokinetikum auf menschliche PMN's wirkt und die Funktionsfähigkeit neutrophiler Granulozyten in der Chemotaxis bzw. in der Chemilumineszenz erhält und steigert.
Über die einzelnen Wirkmechanismen von Echinacin können noch keine sicheren Aussagen gemacht werden. Meiner Meinung nach wäre es daher dringend erforderlich, über die Inhaltsstoffe von Echinacea purpurea bzw. angustifolia und anderer Kompositen intensiv zu forschen. Dies könnte neue Möglichkeiten aufzeigen für eine wirksame Therapie der angeborenen Granulozytenfunktionsstörungen und der iatrogenen Schädigungen des Immunsystems. (Vgl. 1.4)

4. P E R S Ö N L I C H E B E M E R K U N G

Im Zeitalter der Naturwissenschaften werden nur meß- und zählbare Ergebnisse und Beobachtungen anerkannt. Je mehr jedoch der Einzelne sich mit den genauen Zusammenhängen auseinandersetzt, desto schwieriger wird für ihn der Überblick. Dies erkannte schon GOETHE:

"Aber diese trennenden Bemühungen, immer und immer fortgesetzt, bringen auch manchen Nachteil hervor. Das Lebendige ist zwar in Elemente zerlegt, aber man kann es nicht wieder zusammenstellen und beleben. Dies gilt schon von vielen anorganischen, geschweige von organischen." (86)

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die neutrophilen Granulozyten (= polymorphonukleäre Leukozyten, PMN) bilden die erste Abwehrlinie des Immunsystems gegen viele eingedrungene Mikroorganismen. Es sind einige seltene angeborene und zahlreiche erworbene oder symptomatische Granulozytenfunktionsdefekte bekannt, wobei die iatrogenen medikamentösen Schäden zunehmend Bedeutung erlangen.

Ausgehend von der Hypothese, daß Ascorbinsäure einen Histamin-detoxifizierenden Effekt hat, wurde ihre Wirkung auf die Funktion neutrophiler Granulozyten untersucht:

1. Die Chemotaxis von Granulozyten gesunder Spender wird durch 300 ng/ml, 500 ng/ml u. 1000 ng/ml Histamin inhibiert (Percoll-Granulozytenisolation, Chemotaxis nach BOYDEN). Eine H_2-Spezifität der Histamin-Wirkung kann mittels Cimetidine teilweise bestätigt werden.
   Die Chemotaxis-Inhibition mit 300 ng/ml u. 500 ng/ml Histamin wird durch Ascorbatzusatz (4.8 mg% bzw. 8.0mg%) aufgehoben (n = 4 bzw. 16), während bei 1000 ng/ml Histamin mit 16 mg% Ascorbat keine Änderung eintritt (n=5).
2. Die Chemilumineszenz der PMN's wird durch 10 Min. bzw. 30 Min. Vorinkubation mit 500 ng/ml und 1000 ng/ml Histamin nicht beeinflußt.
3. Die Inkubation der PMN's mit 500 ng/ml Histamin verringert den intrazellulären Ascorbatgehalt (Ascorbatbestimmung nach ZANNONI) geringfügig um 5% von 23.2 auf 22.0 $\mu g/10^8$ Zellen (schwach signifikant p = 0.05, n=17). 10^{-4}mol Cimetidine bewirkt eine Verminderung von 9% auf 21.1 μg Ascorb./10^8 Zellen (p = 0.10, n=12) und verhindert bei Mitinkubation die Histamin-bedingte Verminderung des intrazellulären Ascorbats (n = 17).

Die Hypothese, daß Ascorbat via Histamin die Funktion neutrophiler Granulozyten beeinflußt, kann bei 1. + 3. teilweise, jedoch nicht eindeutig bestätigt werden.

In einer 2. Versuchsserie wurde ein standardisiertes Echinacea purpurea-Präparat - Echinacin^{R} (Madaus, Köln) - untersucht. Laut zahlreichen klinischen Berichten und einigen experimentellen Untersuchungen wirkt es immunstimulierend:

Ia) Die Echinacin-Konzentrationen 50 µg/ml + 5 µg/ml erzielen als Chemotaktikum/Chemokinetikum auf PMN's im Vergleich zur CT-Referenz-Substanz 10^{-6}mol N-f-Met-Leu-Phe (NMLP) eine Wirkung von 35% - 50% (n = 20).

Ib) Durch NMLP stimulierte PMN's haben nach 15 Min. Vorinkubation bei 37° eine um 24% geringere CT-Aktivität ($p = 0.005$). Die Mitinkubation von 5 µg/ml Echinacin gleicht diese Aktivitätsminderung aus ($p = 0.005$): Der CT-Wert entspricht 97% der Kontrolle ohne Vorinkubation und 130% der Inkubationskontrolle (n = 10).

IIa) Die Chemilumineszenz (CL) neutrophiler Granulozyten wird durch 10 Min. Vorinkub. mit 5 µg/ml Echinacin im Vergleich zur Kontrolle deutlich stimuliert ($p = 0.01$, von 6.1 auf $6.9 \cdot 10^3$ CPM, n = 7).

IIb) Nach 60 Min. Vorinkub. u. bei suboptimaler Stimulation mit Zymosan sinkt die CL auf unter 30% der Werte von IIa). Die mit 50 µg/ml Echinacin vorinkubierten PMN's zeigen eine um 24 % höhere Aktivität ($p = 0.01$) als die Kontrolle (2.1 bzw. $1.8 \cdot 10^3$ CPM, n = 5).

Die verwendeten Echinacin-Konzentrationen entsprechen wahrscheinlich in-vivo-Bedingungen. Sie wirken Chemotaxis-stimulierend und Granulozyten-protektiv. Aufgrund von Ia) u. Ib) werden eine neue biologische Standardisierungs-Methode für Echinacin und zusätzliche Untersuchungen zu IIa) und IIb) angeregt.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1 ACKERKNECHT, E.H.: Geschichte der Medizin, 4. Aufl., von "Kurze Geschichte der Medizin", Enke, Stuttgart (1979)

2 ALAN, C. and CLEMETSON, B.: Histamine and ascorbic acid in human blood.
J. Nutr. 110, 662-668 (1980)

3 ALBUS, G. und HERING, H.: Behandlung schlecht heilender Wunden, besonders der Beingeschwüre, mit Echinacin.
Med. Klinik 37, 276-279 (1941)

4 ALLEN, R.C.: Halide dependence of the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system of the polymorphonuclear leukocyte in the phenomenon of electronic excitation.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 63, 675-683 (1975)

5 ALLEN, R. C.: Biochemiexcitation: chemiluminescence and the study of biologic oxygenation reactions.
Publikation in Vorbereitung, Manuskript freundlicherweise von Herrn BRUCHELT, G. überlassen

6 ALLEN, R. C.; STJERNHOLM, R. L. and STEELE, R. H.: Evidence for the generation of an electronic excitation state (s) in human polymorphonuclear leucocytes and its participation in bactericidal activity.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 679-684 (1972)

7 ANDERSON, R.: Effects of ascorbate on leucocytes: Part II: Effects of ascorbic acid and calcium and sodium ascorbate on neutrophil phagocytosis and post-phagocytic metabolic activity.
S. Afr. Med. J. 56, 401 - 404 (1979)

8 ANDERSON, R.: Ascorbic acid and immune functions: Mechanism of immunostimulation in: COUNSELL, J.N. and HORNIG, D.H. (Eds.): Vitamin C (ascorbic acid), Elsevier, North Holland (1982)

9 ANDERSON, R. and DITTRICH, D.C.: Effects of ascorbate on leukocytes: Part IV: Increased neutrophil functions and clinical improvement of oral ascorbate in two patients with chronic granulomatous disease. S. Afr. Med. J. 56, 476-480 (1979)

10 ANDERSON, R. and THERON, A.: Effects of ascorbate on leukocytes: Part I: Effects of ascorbate on neutrophil motility and intracellular cyclic nucleotide levels in vitro.
S. Afr. Med. J. 56, 394-400 (1979)

11 ANDERSON, R. and THERON, A.: Effects of ascorbate on leukocytes: Part III: In vitro and in vivo stimulation of abnormal neutrophil motility by ascorbate. S. Afr. Med. J. 56, 429-433 (1979)

12 ANDERSON, R.; GLOVER, A. and RABSON, A.: The in vitro effect of histamine and metiamide on neutrophil motility and their relationship to intracellular cyclic nucleotide levels.
J. Immunol. 118, 1690-1696 (1977)

13 ANDERSON, R.; OOSTHUIZEN, R. and GATNER, E.M.S.: Effects of ascorbate on leukocytes: Part V: Effects of ascorbate and calcium and sodium ascorbate on certain functions of human blood lymphocytes in vitro.
S. Afr. Med. J. 56, 511-516 (1979)

14 ANDERSON, R.; OOSTHIUZEN, R.; MARITZ, R.; THERON, A. and VAN RENDSBURG, A.J.: The effects of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular and humoral immune functions in normal volunteers. Am. J. Clin. Nutr. 33, 71-76 (1980)

15 ANONYMUS: Titel unbekannt
Pharmazeut. Zentralhalle 38, 710 (1897)
zitiert nach SPAICH, W.: Moderne Phytotherapie. 1. Aufl., 205-207, Haug, Heidelberg (1978)

16 ARGESE, E.; RIGO, A.; SCARPA, M.; UGO, P. and VIGLINO, P.: Generation of superoxide in the autooxidation of ascorbate and of glutathione (abstract) in: Book of Abstracts. Third international conference on oxygen radicals in chemistry and biology, 2a - 8 (1983)

17 ARONOVITCH, J.; GZAPSKI, G. and SAMUNI, A.: The correlation between copper binding to cells and the toxicity of superoxide and vitamin C (abstract). In: Third international conference on oxygen radicals in chemistry and biology, Book of abstracts, 11 (1983)

18 BABIOR, B. M.: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (2parts).
N. Engl. J. Med. 298, 659-688, 721-728 (1978)

19 BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S. and CORNUTTE, J.T.: Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent.
J. Clin. Invest., 52, 741-744 (1973)

20 BACHNER, R.L.; GILMAN, N. and KARNOVSKY, M.L.: Respiration and glucose oxidation in human and guinea pig leukocytes: comparative studies. J. Clin. Invest. 49, 692-696 (1970)

21 BAETGEN, D.: Pertussistherapie mit Myo-Echinacin in der Kinderpraxis. Med. Monatsschrift 18, 129-131 (1964)

22 BANERJEE, S.: Physiological role of dehydroascorbic acid. Indian J. Physiol. Pharmacol. 21, 85-89 (1977)

23 BABOUR, A.G.; ALLRED, C.D.; SOLBERG, D.C. and HILL, H.R.: Chemiluminescence by polymorphonuclear leucocytes from patients with active bacterial infections. J. Infect. Dis. 141, 14-26 (1980)

24 BARKHAN, P. and HOWARD, A.N.: Distribution of ascorbic acid in normal and leukaemic human blood. Biochem. J. 70, 163-167 (1958)

25 BAUER, K.M.: Die chronisch-unspezifische Adnexitis des Mannes und ihre derzeitige Behandlung. Medizinische 50, 1863-1865 (1957)

26 BECKER, E.L.: Chemotaxis. J. Allergy Clin. Immunol. 66, 97-105 (1980)

27 BIGLEY, H.R. and STANKOVA, L.: Uptake and reduction of oxidised and reduced ascorbate by human leukocytes. J. Exp. Med. 139, 1084-1091 (1974)

28 BITTNER, E.: Die Wirkung von Echinacin auf die Funktion des Reticuloendothelialen Systems. Med. dent. Dissertation, Universität Freiburg (1969)

29 BLACK, J.W.; DUNCAN, W.A.M.; DURANT, C.J.; GUNELLIN, C.R. and PARSONS, E.M.: Definition and antagonism of histamine H_2- receptors.
Nature 236, 385-390 (1972)

30 BLOKSMA, N.; SCHMIERMANN, P.; DE REUVER, M.; VAN DIJK, H. and WILLERS, J.: Stimulation of humoral and cellular immunity by viscum preparations.
Planta medica 46, 221-227 (1982)

31 BODANNES, R.S. and CHAN, P.C.: Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen.
FEBS Letters 105, 195-196 (1979)

32 BODEMAR, G.; NORLANDER, B. and WALAN, A.: Cimetidine in the treatment of active peptic ulcer disease.
In: BARLAND, W. and SIMIKINS, M.A. (eds.): Cimetidine. 1. Aufl., 224-239, Excerpta Medica, Amsterdam (1977)

33 BOHL, R.: Vorläufige Mitteilung über gute Ergebnisse in der Behandlung von Decubitalgeschwüren mit Echinacea purpurea.
Schw. Med. Wschr. 84, 421 (1954)

34 BOHLMANN, F. und GRENZ, M.: Die Inhaltsstoffe von Echinacea-Arten.
Chem. Berichte 99, 3197-3200 (1966)

35 BOURNE, H.R.; MELMON, K.L. and LICHTENSTEIN, L.M.: Histamine augments leukocyte adenosine 3', 5'-monophosphate and blocks antigenetic histamine release.
Science 173, 743-745 (1971)

36 BOYDEN, S.: Chemotactic effect of antibody and antigen.
J. Exp. Med. 115, 453 (1962)

37 BOXER, L.A.; VANDERBILT, B.; BONSIB, S.; JERSILD, R.; YANG, H-H. and BAEHNER, R.L: Enhancement of chemotactic response and mikrotubule assembly in human leucocytes by ascorbic acid.
J. Cell. Physiol. 100, 119-126 (1979)

38 BOXER, L.A.; WATANABE, A.M.; RISTER, M.; BOSCH, H.R.; ALLEN, J.A. and BAEHNER, R.C.: Correction of leukocyte function in chediak-higashi-Syndrome by ascorbate.
N. Engl. J. Med. 295, 1044-1050 (1976)

39 BREKHMAN, I. and DARDYMOO, M.: Pharmacological Investigations of Glykosides from Ginseng and Eleutherococcus.
Lloydia 32, 46-51 (1969)

40 BRIMBLECOMBE, R.W.; DUNCAN, W.A.M.; DURANT, G.J.; GANELLIN, C.R.; PARSONS, M.E. and BLACK, J.W.: The pharmacology of cimetidine, a new histamine H_2- receptor antagonist.
Brit. J. Pharmacol. 53, 435 (1975)

41 BROOK, K.M. and GRIMSHAW, J.J.: Vitamin C concentrations of plasma and leukocytes as related to smoking habit, age and sex of humans.
Am. J. clin. Nutr. 21, 1254-1263 (1968)

42 BRUCHELT, G: (persönliche Mitteilung, 1983)

43 BRUCHELT, G. and SCHMIDT, K.: Comparative studies on the determination of phagocytic activity with luminol-dependent chemiluminescence. Part I: Measurements in whole blood. Part II: Measurements of isolated cells.
Z. Klin. Chem. (1983, zur Publikation angenommen)

44 BÜLIMANN, B.; WILDFEUER, A.; SCHINDELBECK, U.; KLEIHAUER, E.; HEIMPEL, H.; WIGGER, H.J. and HAFERKAMP, O.: Critical analysis of granulocyte function in 154 patients with different diseases. Klin.Wschr. 60, 1289-1295 (1982)

45 BÜSING, K.H.: Hyaluronidasehemmung durch Echinacin. Arzneim.Forsch. 2, 467-469 (1952)

46 BÜSING, K.H.: Die Beeinflussung des Properdin-Spiegels durch Extrakte aus Echinacea purpurea bei Kaninchen. Z. Immunitätsforschung u. exp. Thp. 115, 169-176 (1958)

47 BUISSERET, P.D.: Allergie: Wenn die Immunabwehr Fehler macht. Spektrum d. Wissensch. Okt., 26-36 (1982)

48 BUNDESVERBAND DER PHARMAZEUTISCHEN INDUSTRIE E.V.: Rote Liste 1982. Editio Cantor, Aulendorf (1982)

49 CASTELLI, A.; MARTORANA, G.E.; MEUCI, E. and BONETTI, G.: Vitamin C in normal human mononuclear and polymorphonuclear leucocytes. Acta Vitaminol. Enzymol. 4, 189-196 (1982)

50 CHARI-BITRON, A.; MOTOLA, L.; KAPLUN, A. and SHAHAG,A.: Correlation between chemiluminescence response and rate of zymosan uptake by rat alveolar macrophages. Scanning electron microskope observations. Cell Biology Internat. Rep. 7, 4-12 (1983)

51 CHATTERJEE, J.B.; GUPTA, D.S.; MAJUMDER, A.K.; NANDI, B.K. and SUBRAMANIAN, N.: Effect of ascorbic acid on histamine metabolism of scorbutic guinea-pigs. J. Physiol. 251, 271-279 (1975)

52 CHATTERJEE, J.B.; MAJUMDER, A.K.; NANDI, B.K. and SUBRAMANIAN, N.: Synthesis and some major functions of vitamin C in animals.
Ann. N.Y. Ac.Sci 258, 24-47 (1975)

53 CHÉDIAK, M.: Nouvelle anomalie leucocytine de caractère constitutionnelle et familial.
Rev. Hémat. 7, 362 (1952)

54 CHESON, B.D.; CHRISTENSEN, R.L.; SPERLING, R.; KOHLER, B.E. and BABIOR, B.M.: The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes.
J.Clin.Invest. 58, 789-796 (1976)

55 CHONÉ, B.: Gezielte Steuerung der Leukozytenkinetik durch Echinacin.
Ärztl. Forsch. 19, 611-612 (1965)

56 CHONÉ, B. and MANIDAKIS, G.: Echinacin-Test zur Leukozytenprovokation bei effektiver Strahlentherapie.
D.Med.Wschr. 94, 1406-1410 (1969)

57 CHRÉTIEN, J.K. and GARAGUSI, V.F.: Correction of corticoid-induces defects of polymorphonuclear neutrophil function by ascorbic acid.
J. reticuloendoth. Soc. 14, 280-286 (1973)

58 CHRISTOU, N.V. and MEAKINS, J.L.: Neutrophil function in anergic surgical patients - neutrophil adherence and chemotaxis.
Ann. Surg. 190, 557-564 (1979)

59 CLARK, C.; GALLIN, J.J. and QUIE, P.G. (eds.): Leukocyte chemotaxis: methods, physiology and clinical implications. 1. Auflage, 329, Raven, New York (1978)

60 CZAPSKI, G.; ARONOVITCH, J.; GODINGER, D. and SAMUNI, A.: On the mechanisms of cytotoxicity induced by superoxide (abstract). In: Third International Conference on Oxygen Radicals in Chemistry and Biology, Book of Abstracts, 12 (1983)

61 DALE, H.H.: The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea pig. J.Pharmacol. exp. Ther. 4, 167-223 (1912 - 1913)

62 DALLEGRI, F.; LANZI, G. and PATRONE, F.: Effect of ascorbic acid on neutrophil locomotion. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 61, 40-45 (1980)

63 DE CHATELET, L.R.; MC CALL, C.E.; COOPER, M.R. and SHIRLEY, P.S.: Ascorbic acid levels in phagocytic cells. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 145, 1170-1173 (1974)

64 DENSON, K.W. and BOWERS, E.F.: The determination of ascorbic acid in white blood cells - a comparison of W.B.C. ascorbic acid and phenolic acid excretion in elderly patients. Clin.Sci. 21, 157-162 (1961)

65 DOPFER, R.; DÖRING, M.; NEEF, A.; KOLLMANN, W. und NIETHAMMER, D.: Letaler Granulozytenfunktionsdefekt bei einem männlichen Säugling - Ergebnisse einer in-vitro und in-vivo Stimulation mit Ascorbinsäure sowie in-vitro Stimulation mit Levamisol und Lithiumchlorid. Monatschr. Kinderheilkd. 130, 891-895 (1982)

66 DREWS, J.: Möglichkeiten der Immunstimulation. Sandorama, 12-15 (1980)

67 DUBEY, S.S.; SINTRA, K.K.; GUPTA, J.P. and BANI, N.: Ascorbic acid, dehydroascorbic acid, glutathione and histamine in peptic ulcer. Indian J. Med. Res. 76, 859-862 (1982)

68 EMMINGSHAUS, P. and GUTHY, E.: Perioperativer Ascorbinspiegel und zelluläre Abwehr. Chir.Forum.Exp.Klin.Forsch., 167-171 (1978)

69 ESCHENBACH, C.: Luminol-Chemilumineszenz phagozytierender neutrophiler Granulozyten. Klin. Wochenschr. 60, 357-364 (1982)

70 EVANS, R.M.; CURRIE, L. and CAMPBELL, A.: The distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood, in normal individuals and its relation to the plasma concentration. Br. J. Nutr. 47, 473-482 (1982)

71 FELDER, H.: Über die Behandlung chronisch unspezifischer Insuffizienz der Blase und œr Urethra. Med. Klinik 54, 525-526 (1959)

72 FISCHER, H. and STAUDINGER, H.J.: Chemilumineszenz, ein Indikator für Zellaktivierung? Klin. Wschr. 59, 199-201 (1981)

73 FITCHEN, J. H. and KOEFFLER, H.P.: Cimetidine and granulopoesis: Bone marrow culture studies in normal man and patients with cimetidine-associated neutropenia. Br. J. Haematol. 46, 361-366 (1980)

74 FORTH, W. und RUMMEL, W.: Vitamine und Spurenelemente - Therapie des Vitaminmangels. In: FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 3. überarb. Aufl., 360-370, Bibliographisches Institut, Zürich (1980)

75 FRANKEN, E. und SÖNNICHSEN, N.: Zur Therapie rezidivierender Venucae vulgares.
Aesthet. Med. 15, 242-245 (1966)

76 FRIEDENBERG, W.R.; MARX, J.J.; HENSEN, R.L. and HASELBY, R.C.: Hyperimmunoglobulin E syndrome: response to transfer factor and ascorbic acid therapy.
Clin.Immunol.Immunopathol. 12, 132-142 (1979)

77 FULDER, S.: Ginseng, useless root or subtle medicine?
New Scientist, 138-139 (1977)

78 FUNKE, H.: Neue Erkenntnisse über Echinacea.
Zeitschr. Phytothp. 4, 650 -656 (1983)

79 GALLIN, J.J.: Abnormal phagocyte chemotaxis: pathophysiology, clinical manifestations, and management of patients.
Rev. Inf. Dis. 3, 1196-1220 (1981)

80 GALLIN, J.J. and QUIE, P.G. (eds): Leukocyte chemotaxis: methods physiology and clinical implications.
Raven, 1. Aufl., New York (1978)

81 GALLIN, J.J.; ELIN, R.J.; HUBERT, R.T.; FAUCI, A.S.; KALINER, M.A. and WOLFF, S.M.: Efficacy of ascorbic acid in Chediak-Higashi syndrome (CHS): studies in humans and mice.
Blood 53, 226-234 (1979)

82 GERBES, A.L.; SCHICK, P. und MESSERSCHMIDT, O.: Untersuchungen über die Wirkung von Pflanzenextrakten (Echinacea Complex^{R}) bei akuter Strahlenkrankheit von Mäusen.
Zeitschr. f. Phytothp. 4, 645-649 (1983)

83 GEROK, W.: Avitaminosen.
In: GROS, R. und SCHÖLMERICH, P.C. (Hrg.):
Lehrbuch der Inneren Medizin, 6. Aufl., 793-805,
Schattauer, Stuttgart/New York, (1982)

84 GESPACH, C.; SAAL, F.; COST, H. and ABITA, J.-P.:
Identification and characterization of surface receptors for histamine on the human promyelocytic leukemia cell line HL-60 - comparison with human peripheral neutrophils.
Molecular Pharmacol. 22, 547-553 (1982)

85 GIESBERT, H.: Titel unbekannt
Fortschr. d. Therapie 19, 133-137 (1943)
zit. nach: SPAICH, W.:
Moderne Phytotherapie, 206, Haug, Heidelberg (1978)

86 GOETHE, J.W.v.: Botanik: Zur Morphologie der Pflanzen.
Die Tempel-Klassiker, Band 8, 2. Aufl., 672,
Emil Vollmer, Wiesbaden (1932)

87 GOETZL, E.J.: Defective responsiveness to ascorbic acid of neutrophil random and chemotactic migration in Felty's syndrome and systemic lupus erythematosus.
Ann. Rheum. Dis. 35, 510-515 (1976)

88 GOETZL, E.J.; WASSERMAN, S.I.; GIGLI, J. and AUSTEN, K.F.: Enhancement of random migration and chemotactic response of human leukocytes by ascorbic acid.
J.Clin.Investig. 53, 813-818 (1974)

89 GREBNER, J.V.; MILLS, E.L.; GRAY, B.H. and QUIE, P.G.:
Comparison of phagocytic and chemoluminescence response of human polymorphonuclear neutrophils.
J.Clin.Med. 89, 153-159 (1977)

90 GUNDERT-REMY, U.; SCHMIDLIN. O. und SCHROEDER, H.: Einführung in die klinische Pharmakologie zum besseren Verständnis der Arzneitherapie. 1. Aufl., Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1983)

91 HÄNSEL, R.: Anti-infektiöse Prophylaxe durch Immunstimulantien - unter besonderer Berücksichtigung der Phytopharmaka. Z.schr. angewandte Phytothp. V, 172-180 (1981)

92 HÄNSEL, R. und HAAS, H.: Therapie mit Phytopharmaka. 1.Aufl., 258-259, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1983)

93 HÅKANSON, L.; HÜLLGREN, R.; VENGE, P.; ARTURSON, G. and VEDUNG, S.: Hyaluronic acid stimulates neutrophil function in vitro and in vivo. Scand. J. Infect. Dis. 24, 54-59 (1980)

94 HARVATH, L.; AMIRAULT, H.J. and ANDERSEN, B.R.: Chemiluminescence of human and canine polymorphonuclear leukocytes in the absence of phagocytosis. J.Clin.Invest. 61, 1145-1154 (1978)

95 HEESEN, W.: Unspezifische Behandlungsmöglichkeiten bei tuberkulösen Erkrankungen. Erfahrungsheilkunde 13, 33-41 (1964)

96 HILL, R.H. and QUIE, P.G.: Raised serum Ig E-levels and defective neutrophil chemotaxis in three children with eczema and recurrent infection. Lancet 1, 183-187 (1974)

97 HILL, H.R.; WILLIAMS, P.B. and KRUEGER, G.G.: Recurrent staphylococcal abscesses associated with defective neutrophil chemotaxis and allergic rhinitis. Ann.Intern.Med. 85, 39-43 (1976)

98 HILL, R.H.; ESTERSEN, R.P.; HOGAN, N.A. and QUIE, P.G.: Severe staphylococcal disease associated with allergic manifestations, hyperimmunoglobulinemia and defective neutrophil chemotaxis.
J.Lab.Clin.Med. 88, 796-806 (1976)

99 JUNG, H.-D. und SCHROEDER,H.: Titel unbekannt.
Archiv für Dermatologie und Syphilis 197, 130-144 (1954)
zit. nach: SPAICH, W.: Moderne Phytotherapie, 1.Aufl., 203-207, Haug, Heidelberg (1978)

100 KALUS, W.H. and FILBY, W.G.: The effect of inhibitors on the radical formation in aqueous solutions of ascorbic acid.
Internat.J.Vit.Nutr.Res. 52, 44-49 (1982)

101 KLEIN, K.: Die primär chronische Polyarthritis und ihre Behandlung.
Medizinische 16, 43-45 (1953)

102 KOCH, Fr.E. und ÜBEL, H.: Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Echinacea purpurea auf das Hypophysen-Nebennierenrinden-System.
Arzneim.Forsch. 3, 133-137 (1953)

103 KOCH, Fr.E. und ÜBEL, H.: Experimentelle Untersuchungen über die lokale Beeinflussung der Gewebsresistenz gegen Streptokokkeninfektion durch Cortison und Echinacin.
Arzneim.Forsch. 4, 551-560 (1954)

104 KORDANSKY, D.W.; ROSENTHAL, R.R. and NORMAN, P.S.: The effect of vitamin C on antigen-induced bronchospasm.
J.Allergy Clin. Immunol. 63, 61-64 (1979)

105 KORTING, G.W. und RAPP, K.: Erfahrungen mit einer zusätzlichen Echinacin-Behandlung der Psoriasis vulgaris.
Medizinische 45, 1504-1508 (1954)

106 KUHN, O.: Echinacin und Phagozytenreaktion.
Arzneim.Forsch. 3, 194-200 (1953)

107 LEBER, T.: Über die Entstehung der Entzündung und die Wirkung der entzündungserregenden Schädlichkeiten.
Fortschr.Med. 6, 460-464 (1888)

108 LEIBOVITZ, B. and SIEGEL, B.V.: Ascorbic acid, neutrophil function and the immune response.
Internat. J. Vit. Nutr. Res. 48, 159-164 (1978)

109 LEIBOVITZ, B. and SIEGEL, B.V.: Ascorbic acid and the immune response.
Symposion on diet and resistance to disease, Houston, Tex. (1980)
Ado.exp.Med. Biol. 135, 1-25 (1981)

110 LEWIN, S.: Vitamin C, its molecular biology and medical potential. LEWIN, S. (Edit.)
Acad.Press, London (1976)

111 LOH, H.S. and WILSON, C.W.M.: An improved method for the measurement of leucocyte ascorbic acid concentrations.
Internat. J. Vit. Nutr. Res. 41, 90-98 (1971)

112 LÜTHY, R. und SIEGENTHALER, W.: Status febrilis: Defekte des Phagozytosesystems (6.54). In: SIEGENTHALER, W. und HEGGLIN, M. (Hrsg.): Differentialdiagnose innerer Krankheiten.
14. Aufl., Tieme, Stuttgart-New York, (1980)

113 MADAUS & Co., Köln: Informationen zum Präparat Echinacin^{R}.
Dr.Madaus & Co., Köln (1980)

114 MADAUS, G.M.: Echinacea. In: Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Band II, 1248 - 1254, G.Olms, Hildesheim (1976)
Nachdruck: Tieme, Leibzig (1938)

115 MC PHAIL, L.C. and SNYDERMAN, R.: Activation of the respiratory burst enzyme in human polymorphnuclear leucocytes by chemoattractants and other soluble stimuli - evidence that the same oxidase is activated by different transductional mechanisms.
J.Clin.Invest. 72, 192-200 (1983)

116 MEISSNER,F.: Medikamentöse Beeinflussung der Nekroserate von Hautlappen im Tierversuch.
Med.Dissertation, Univ. München (1980)

117 METCHNIKOFF, E.: L'immunité dans les maladies infectieuses.
Masson (1901)

118 METZGER, J.: Gesichtete homöopathische Arzneimittellehre.
4.Aufl., Band I, 618-621, Haug, Heidelberg (1977)

119 MILLER, T.E.: Killing and lysis of gram-negative bacteria through the synergestic effect of hydrogen peroxide, ascorbic acid and lysozyme.
J.Bacteriol. 98, 949-955 (1969)

120 MOELL, O.H.: Primäre Ergebnisse der Echinacin-Behandlung bei entzündlichen Unterleibserkrankungen.
Der Krankenhausarzt 24, 299-302 (1951)

121 MOSTBECK, A. und STUDLAR, M.: Experimentelle Untersuchungen eines Pflanzenextraktes aus Echinacea purpurea Moench als unspezifischer Reizkörper.
Wiener Med. 112, 259-262 (1962)

122 MUND-HOYM, W.-D.: Wundbehandlung mit Echinacea-haltigen Externa.
Ärztl.Praxis 31, 566 (1979)

123 NANDI, B.K.; SUBRAMANIAN, N.; MAJUMDER, K. and CHATTERJEE, J.B.: Effect of ascorbic acid on detoxification of histamine under stress conditions.
Biochem. Pharmacol. 23, 643-647 (1974)

124 NELSON, R.D.; MILLS, E.L.; SIMMONS, R.L. and QUIE, P.G.: Chemiluminescence response of phagocytizing human monocytes.
Infect. Immun. 14, 129-134 (1976)

125 NIETHAMMER,D.; WILDFEUER,A.; KLEIHAUER,E. und HAFERKAMP,O.: Granulozytenfunktion - I. Angeborene Störungen
Klin.Wochenschr. 53, 643-652 (1975)

126 NIETHAMMER,D.; WILDFEUER,A.; KLEIHAUER,E. und HAFERKAMP,O.: Granulozytenfunktion - II. Erworbene Störungen
Klin.Wochenschr. 53, 739-746 (1975)

127 NIKI,E.; YAMAMOTO,Y. and KAMIYA,Y.: Oxidation of phosphatidylcholine and its inhibition by vitamin E and vitamin C. (abstract) in:
Third International Conference on Oxygen Radicals in Chemistry and Biology, Book of Abstracts, 2b - 3 (1983)

128 OBERRITTER,H.: Dissertationsschrift, Publikation in Vorbereitung (1984)

129 OLUSI, S.O.; OJUTIKU, O.O.; JESSOP, W.J.E. and IBOKO, M.I.: Plasma and white blood cell ascorbic acid concentrations in patients with bronchial asthma.
Clin.Chim.Acta 92, 161-166 (1979)

130 ORINDA, D.; DIEDERICH, H. und WACKER, A.: Antivirale Aktivität von Inhaltsstoffen der Composite Echinacea purpurea.
Arzneim.Forsch. 23, 1119 (1973)

131 ORTNER, J.M.: The oxidation of endogenous ascorbic acid during histamin secretion by rat peritoneal mast cells.
Exp.Cell Res. 129, 485 - 486 (1980)

132 PANUSH, R.S.; KATZ, P.; POWELL, G. and SOMBERG, L.: Immunopharmacologic effects of vitamin C,
IV. Pertubation of mononuclear cell cyctic nucleotides.
Internat.J.Vit.Nutr.Res. 53, 61-67 (1983)

133 PATRONE, F.; DALLEGRI, F.; LANZI, G. and SACCETTI,C.: Reversal by cimetidine of histamine - induced inhibition of true chemotaxis in neutrophil polymorphonuclears.
Res.Exp.Med. (Berl.) 176, 201-205 (1980)

134 PATRONE, F.; DALLEGRI, F.; BONVINI, E.; MINERVINI,F. and SACCHETTI, C.: Disorders of neutrophil function in children with recurrent pyogenic infections.
Med.Microbiol.Immunol. 171, 113-122 (1982)

135 PAULING, L.: Evolution and the need for ascorbic acid.
Proc.Nat.Acad.Sci 67, 1643-1658 (1970)

136 PFEFFER,W.: Unters. Bot. Inst. Tübingen 1, 363 (1884) zit.nach: SNYDERMAN, R. and GOETZL, E.J.: Molekular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis.
Science 213, 830-837 (1981)

137 PLAUT, M.; LICHTENSTEIN, L.M. and BLOCH, K.J.: Failure to obtain histamine release from rat mast cells exposed to human allergic serum and specific antigen or IgE myeloma protein and anti IgE.
J. Immunol. 111, 1022-1030 (1973a)

138 PLAUT, M.; LICHTENSTEIN, L.M.; GILLESPIE, E. and HENNEY, C.S.: Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis. IV. Specificity of the histamine receptor on effector T-cells.
J.Immunol. 111, 389-394 (1973)

139 PLECITYJ, K.D.: Die Rolle der Ascorbinsäure bei der Regulierung immunologischer Reaktionen.
(Übersetzung aus dem Russischen)
Voprosy pitanija 4, 18-27 (1979)

140 POHL, P.: Zur Therapie der strahlenbedingten Leukopenie mit Esberitox^{R}.
Med. Klinik 64, 1546-1547 (1969)

141 QUIE, P.G.; WHITE, J.G.; HOLMES, B. and GOOD, R.A.: In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood.
J.Clin.Invest. 46, 668-679 (1967)

142 RAWAL, B.D.: Bactericidal action of ascorbic acid on pseudomonas aeruginosa: alteration of cell surface as a possible mechanism.
Chemotherapy 24, 166-171 (1978)

143 REBORA, A.; DALLEGRI, F. and PATRONE, F.: Neutrophil dysfunction and repeated infections: influence of levamisole and ascorbic acid.
Br.J. Dermat. 102, 49-56 (1980)

144 REUSS, D.: Echinacin in der Therapie der primär-chronischen Polyarthritis.
Allgemeinmed. 57, 865 (1981)

145 RISTER, M.: Grundlage und Diagnostik granulozytärer Phagozytosestörungen.
Dtsch.Med.Wschr. 43, 1535-1539 (1979)

146 RISTER, M. und HONECKE, C.: Therapie des Steinbrinck-Chediak-Higashi-Syndroms.
Klin.Paediat. 192, 19-24 (1980)

147 ROOT, R.K.: The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils.
Rev.Infect. Dis. 3, 565-598 (1981)

148 ROOT, R.K. and BEESON, P.B.: Genetic disorders of leukocyte function: what they tell us about normal anti-microbial mechanisms of human phagocytic cells.
Klin. Wschr. 60, 731-734 (1982)

149 ROSEN, H. and KLEBANOFF, S.J.: Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system.
J.Biol.Chem. 252, 4803-4810 (1977)

150 SANDLER, J.A.; GALLIN, J.I. and VAUGHAN,M.: Effects of serotonin, carbarmycholine and ascorbic acid on leukocte GMP and chemotaxis.
J.Cell.Biol. 64, 480-484 (1975)

151 SBARRA, J.; JACOBS, A.A.; STRAUSS, R.R.; PAUL, B.B. and MITCHELL, G.W.: The biochemical and antimicrobial activities of phagocytizing cells.
Am.J.Clin.Nutr. 24, 272-281 (1971)

152 SCHAYER, R.W.: Evidence that induced histamine is an intrinsic regulator of the mikrocirculatory system.
Am.J.Physiol. 202, 66-71 (1962)

153 SCHIMMEL, K.Ch. und WERNER, G.T.: Unspezifische Steigerung der körpereigenen Abwehr durch Echinacin^{R}-Gaben.
Ther.d.Gegenw. 120, 1063-76 (1981)

154 SCHMIDT, K.; OBERRITTER, H.; BRUCHELT, G.; HAGMAIER, V. and HORNIG, D.: Studies on the metabolic conversion of ascorbate.
Internat.J.Vit.Nutr.Res. 53, 77-86 (1983)

155 SCHULTZ, W.H.: Physiological studies in anaphylaxis. I.The reaction of smooth muscle of the guinea pig sensitized with horse serum.
J.Pharmacol.exp.Ther. 1, 549-567 (1910)

II. Reaction of smooth muscle from guinea pigs rendered tolerant to large doses of serum.
J.Pharmacol.exp.Ther. 2, 221-229 (1910)

156 SCHUSTER, A.: Behandlung der Adnexitis chronica mit Echinacin.
Med. Monatsschr. 6, 453-455 (1952)

157 SEGAL,A.; FORTURATO,A. and HERD,T.: A rapid single centrifugation step method for the separation of erythrocytes, granulocytes and mononuclear cells on continous density gradients of Percoll.
J.Immunol.Methods 32, 209-214 (1980)

158 SELIGMAN, B. and GALLIN, J.I.: Pharmacologically defined H_1 and H_2 histamine receptors on human neutrophils modulate chemoattractant f-Met-Leu-Phe-stimulated functions (abstract)
Clin.Res. 29, 172 A (1981)

159 SHARMA, S.C.: Levels of total ascorbic acid histamine and prostaglandins E_2 and $F_2\alpha$ in the maternal antecubital and foetal umbilical vein blood immediately following the normal human delivery.
Internat.J.Vit.Nutr.Res. 52, 320-325 (1982)

160 SHARMA, S.C. and WILSON, C.W.M.: The cellular interaction of ascorbic acid with histamine, cyclic nucleotides and prostaglandines in the immediate hypersensitivity reaction.
Internat.J.Vit.Nutr.Res. 50, 161-170 (1980)

161 SHARMA, S.C.; WALZMAN, M.; MOLLOY, A. and BONNAR,J.: Relationship of total ascorbic acid to prostaglandins $F_2\alpha$ and E_2 levels in the blood of women during the 3rd trimester of normal pregnancy.
Internat.J.Vit.Nutr.Res. 52, 312-319 (1982)

162 SHILOTRI, P.G.: Phagozytosis and leukocyte enzymes in ascorbic acid deficient guinea pigs.
J.Nutr. 107, 1513-1516 (1977)

163 SHILOTRI, P.G.: Glycolytic, hexose monophosphate shunt and bactericidal activities of guinea pig leukocytes in ascorbic acid defiencency.
J.Nutr. 107,1556 - 1566 (1977)

164 SHILOTRI, P.G. and BHAT, K.S.: Effect of mega doses of vitamin C on bactericidal activity of leukocytes.
Am.J.Clin.Nutr., 30 , 1077-1081 (1977)

165 SICKEL, K.: Wundsalbe in der Allgemeinpraxis.
Ärztl. Praxis 23, 201 (1971)

166 SILBERNAGL, S. und DESPOPOULOS, A.: dtv-Atlas der Physiologie - Tafeln und Texte zu den Funktionen des menschlichen Körpers, 1.Aufl., 125, Tieme, Stgt-New York, DTV, München (1979)

167 SIMON, J.D.; JANSEN, C.J.; RIZZI, C.A. and ALBALA, M.M.: The effect of cimetidine on histamine - inhibited release of azurophilic and specific granule constituants of human granulocytes.
BLOOD 54, 79A, Abstract 170 (1979)

168 SMITH, G.S. and LUMSDEN, J.H.: Review of neutrophil adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing.
Veter.Immunol.Immunopath. 4, 177-236 (1983)

169 SMITH, J.H. and WALKER, J.R.: The effects of some antirheumatic drugs on an in-vitro model of human polymorphnuclear leukocytes chemokinesis.
Br.J.Pharmac. 69, 473-478 (1980)

170 SMOGORZEWSKA, E.M.; LAYWARD, L. and SOOTHILL, J.F.: T-lymphocyte mobility: defects and effects of ascorbic acid, histamine and complexed IgG.
Clin.exp.Immunol. 43, 174-179 (1981)

171 SNOOK, J.T.; LONDON, C.P. and DELANY, J.P.: Supplementation frequency and ascorbic acid status in adult males.
Am.J.Clin.Nutr. 37, 532-539 (1983)

172 SNYDERMAN, R. and GOETZL, E.J.: Molekular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis.
Science, 23, 830-837 (1981)

173 SONAK, R.: Histaminfreisetzung aus sensibilisierten Zellen. Ein Beitrag zur Klärung der Pathogenese allergischer Reaktionen.
Med.Habil.schrift, Univ. Münster (1981)

174 SONNET, P.E.: Synthesis of the N-Isobutylamide of All-trans-2,6,10,-Dodecatetraenoic Acid.
J.Org.Chemistry 43, 1147 ff (1969)

175 SPREAFICO, F. and ANACLERIO, A.: Immunosuppressive agents. In: GOOD, R.A. and DAY, S.B. (eds): Comprehensive immunology, Vol.3, 245-278, Plenum, New York (1977)

176 STANKOVA, L.; RIGAS, D.A. and BIGLEY, R.H.: Dehydroascorbate uptake and reduction by human blood neutrophils, erythrocytes and lymphocytes.
Ann. New York, Acad.Sci 258 , 238-242 (1975)

177 STANKOVA, L.; BIGLEY, R.H.; WYSS, S.R. and AEBI,H.: Catalase and dehydroascorbate reductase in human PMN: possible functional relationship.
Experimentia 35, 852-853 (1979)

178 STANKOVA, L.; GERHARDT, N.B.; NAGEL, L. and BIGLEY, R.B.: Ascorbate and phagocyte function.
Infect.Immun. 12, 252-256 (1975)

179 STANKOVA, L.; RIGAS, D.; HEAD, C.; GAY,B.T. and BIGLEY, R.: Determinants of resistance to radiation injury in blood granulocyte from normal donors and from patients with myeloproliferative disorders.
Rad.Res. 80, 49-60 (1979)

180 STEVENS,P.; WINSTON,D.J. and DYKE, K.K.: In-vitro evaluation of opsonic and cellular granulocyte function by luminol-dependent chemiluminescence: utility in patients with severe neutropenia and cellular deficiency states.
Infect.Immun. 22, 41-51 (1978)

181 STITES, D.P.: Phylogeny of immunity. In: STITES, D.P.; STOLO, J.P.; FUDENBERG,H.H. and WELLS,J.V. (eds): Basic and clinical immunology, 4. Aufl., 87, Los Altos, USA (1982)

182 STOLL, A.; RENZ, J. und BRACK, A.: Isolierung und Konstitution des Echinacosids eines Glykosids aus der Wurzel von Echinacea angustofolia D.C. Helv.Chim.Act. 33, 1877-1893 (1950)

183 SUBRAMANIAN, N.; NANDI, B.K.; MAJUMDER, A.K. and CHATTERJEE, J.B.: Role of L-ascorbic acid on detoxification of histamine. In: Biochemical Pharmacology Vol. 22, 1671-1673, Pergamon, London (1973)

184 THOMAS, W.R. and HOLT, P.G.: Vitamin C and immunity: an assesment of the evidence.
Clin. exp. Immunol. 32, 370-379 (1978)

185 TÜNNERHOFF, K. und SCHWABE, H.K.: Tierexperimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Milzextrakten auf Bindegewebebildungen nach Fibrin-Implantationen.
Arzneim.Forsch. 12, 1171-1174 (1962)

186 TYMPNER, K.-D.: Immunstatus bei chronischen Infekten der oberen Luftwege im Kindesalter.
Münch. med. Wschr. 120, 1055-1056 (1978)

187 TYMPNER, K.-D.: Der immunbiologische Wirkungsnachweis von Pflanzenextrakten.
Zschr. angewandte Phytothp V, 181-184 (1981)

188 VALANCE, D.; HUME, R. and WEYERS, E.: Reassesment of changes in leukocyte and serum ascorbic acid after akute myocardial infarction.
Br.Heart J. 40, 64-68 (1978)

189 VICKERS, R.M.: Cimetidine and the immune system.
In: BARON, J.H. (ed.): Cimetidine in the 80's.
Churchill Livingstone, 238-246 (1981)

190 VIEHMANN, P.: Erfahrungen mit einer Echinacea-haltigen Hautsalbe.
Erfahrungsheilkunde 27, 353-358 (1978)

191 VOADEN, D.J. and JACOBSON, M.: Tumor inhibitors 3: Identification and synthesis of an oncolytic hydrocarbon from "American Coneflower" roots.
J.Med.Chem. 15, 619-623 (1972)

192 VORLAENDER, K.-O. (Hsg.): Immunologie: Grundlagen - Klinik - Praxis. 2. Aufl. Tieme, Stgt.-New York, (1983)

193 WACKER, A. und HILBIG, W.: Virushemmung mit Echinacea purpurea.
Planta medica 33, 89-102 (1978)

194 WAGNER, H.: Vom Phytotherapeutikum zum Phytopharmakon. (Symposium am 4.4.81 in München) zit. nach: SCHIMMEL, K.Ch. und WERNER, G.T.: Unspezifische Steigerung der körpereigenen Abwehr durch Echinacin^{R}- Gaben.
Ther.d. Gegenw. 120, 1065-1076 (1981)

195 WAGNER, H.: Arzneipflanzen zur Stimulierung der körpereigenen Immunabwehr.
Dtsch. Apoth.Ztg. 123, 392 (1983)

196 WAGNER, H. und PROKSCH, A.: Über ein immunstimulierendes Wirkprinzip aus Echinacea purpurea Moench.
Ztschr. angew. Phytothp. V, 166-171 (1981)

197 WALKENSTEIN, S.-S.; DUBB, J.W.; RANDOLPH, W.C. WESTLAKE, W.J.; STOTE, R.M. and INTOCCIA, A.P.: Bioavailability of cimetidine in man.
Gastroenterology 74, 360-365 (1978)

198 WEISS, C.: Funktion des Blutes. In:
SCHMIDT, R.F. und THEWS, G.: Physiologie des Menschen. 19. Aufl., 330-332, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1977)

199 WEISS, R.F.: Lehrbuch der Phytotherapie, 5. Aufl. 264-265, Hippokrates, Stuttgart (1982)

200 WERNER, G.H. und FLOC'H, F.: The pharmacology of immunoregulation. 397-403, Academic Press, London (1978)

201 WILKINSON, P.C.: Chemotaxis and inflammation. 1st ed. Churchill Livingston, Edinburgh-London (1974)

202 WINDAUS, A. und VOGT, W.: Synthese des Imidazolyläthylamins.
Ber.Dtsch.Chem.Ges. 40, 3691-3695 (1907)

203 WINKLER, K.: Die Aristolochiasäure in der Dermatologie. In: ROTHENBERG, W. und SIECK.H. (Hrsg.): Der chronische Infekt, 59-63, Madaus, Wien-Köln (1980)

204 WINTERBOURN, C.C. and VISSERS, M.C.M.: Changes in ascorbate levels on activation of human neutrophils.
Biochim.Biophys.Acta 763, 175-179 (1983)

205 ZANNONI, V.; LYNCH,M.; GOLDSTEIN,S. and SATO,P.: A rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissues.
Biochem. Med. 11, 41-48 (1974)

206 ZIGMOND, S.H.: Chemotaxis by polymorphnuclear leukocytes.
J.Cell.Biol. 77, 269-287 (1978)

207 ZIGMOND, S.H. and HIRSCH, J.C.: Leucocyte locomotion and chemotaxis. New method for evaluation and demonstration of cell-derived chemotactic factor.
J.Exp.Med. 137, 387-398 (1973)

208 ZIMMERMANN, O.: Die Therapie des Keuchhustens mit Myo-Echinacin.
Hippokrates 40, 233-235 (1969)

209 ZIMMERMANN, W.: Erfahrung mit der Phytotherapie.
Zschr. angewandte Phytothp. II, 46-49 (1981)

210 ZUSKIN, E.; LEWIS, A.J. and BOUHUYS, A.: Inhibition of histamine - induced airway constriction by ascorbic acid.
J.Allergy Clin.Immunol. 51, 218-225 (1973)

D A N K S A G U N G

An dieser Stelle danke ich Herrn Priv.Doz. Dr.Dr. K.Schmidt für die Überlassung des Themas und für wichtige Hinweise zur Durchführung und Auswertung der Versuche. Mein Dank gilt auch Herrn Helmut Oberritter für die wissenschaftliche Beratung (Ascorbatbestimmung) und Bereitstellung einiger Versuchsergebnisse zum Thema Ascorbinsäure und Histamin.
Frau Danuta Sobieski (Chemotaxis), Frau Jutta Ollhof-Gauger und Frau Sabine Koroschak (Chemilumineszenz) möchte ich für die ausgezeichnete technische Assistenz danken.
Herrn Dr. Gernot Bruchelt verdanke ich wertvolle methodische Hinweise. Auch allen anderen Mitgliedern der Laborgruppe Schmidt möchte ich Dank sagen für viele gute Tips und hilfreiche Unterstützung.
Für die kritische Durchsicht der Literaturangaben sowie für die Einarbeitung in die Technik der Chemotaxis bedanke ich mich bei Herrn Walter Hörer, ebenso bei Herrn Roland Kachler für die Beratung bei der statistischen Auswertung.
Im Graphik- und Fotolabor der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen bei Herrn Walter Müller und Herrn Erwin Eiben konnte ich dankenswerterweise unter fachmännischer Anleitung die Schaubilder anfertigen.
Eine große Hilfe war mir auch meine Frau Elke Krause bei der Überarbeitung des Manuskripts. Ihr verdanke ich manche kritische Anregung bei der Abschrift der Rohentwürfe sowie der Endfassung. Ohne ihre geduldige Unterstützung wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich geworden.

Göppingen, im April 1984

L E B E N S L A U F

Name:	Krause, Wolfgang
Geburtsdaten:	12. Dez. 1954 in Ludwigsburg
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder
Schulbesuch:	1962 - 1966 Grundschule Asperg 1966 - 1974 Mörike-Gym. Ludwigsburg Juni 1974 Abitur
Krankenpflege-praktikum:	Sept. 1974 - Febr. 1975 Kreiskrankenhaus Ludwigsburg
Zivildienst:	Febr. 1975 - Mai 1976 Kreiskrankenhaus Ludwigsburg
Schulbesuch:	Mai 1976 - Mai 1979 Heilpraktikerfach-schule Saarbrücken/Nonnweiler, Heilpraktikerprüfung August 1979
Pflegehelfer:	Juni 1979 - Sept. 1979 Kreiskrankenhaus Ludwigsburg
Medizinstudium:	WS 79/80 - WS 81/82 Homburg/Saar - Ärztl. Vorprüfung Sept. 1981 SS 82 - SS 84 Tübingen - 1. Abschnitt Ärztl. Prüfung Sept. 82 - 2. Abschnitt Ärztl. Prüfung Sept. 84 WS 84/85 + SS 85 Ulm: Praktisches Jahr an der Klinik a. Eichert, Göppingen Wahlfach: Gynäkologie - 3. Abschnitt Ärztl. Prüfung 30.10.85

Druck Köhler Tübingen